REZEPTOREN FÜR VASOAKTIVES INTESTINALES PEPTID (VIP):

Untersuchungen zu ihrer Existenz bei menschlichen T-Lymphozyten

Adrian Danek

Diss München
1987

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der
Universität München
(Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn)

REZEPTOREN FÜR VASOAKTIVES INTESTINALES PEPTID (VIP):

UNTERSUCHUNGEN ZU IHRER EXISTENZ BEI MENSCHLICHEN T-LYMPHOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Adrian Danek
aus
München
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. W. Londong

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juni 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

I, Einleitung

1, Peptide als Botenstoffe ("messenger").....1

2, VIP: Vorkommen, Sequenz, Funktion, Pathophysiologie.....4

3, Eine Rolle für VIP in der Funktion zirkulierender Zellen?.9

4, Rezeptortheorie.....11

II, Problemstellung

Gibt es Rezeptoren für VIP auf menschlichen T-Lymphozyten?..17

III, Methoden

1, Gewinnung der Lymphozyten.....20

2, Radioaktive Markierung von VIP.....26

3, Radioimmunassay für VIP, spezifische Aktivität.....29

4, Bindungsstudien.....36

5, Dünnschichtchromatographie.....39

6, Quantitative Auswertung.....40

IV, Ergebnisse

1, Vorversuche: Festlegung der Reaktionsbedingungen.....41

2, Zeitverlauf der Bindungsreaktion.....48

3, Reversibilität und enzymatischer Abbau.....50

4, Einfluß der Zellkonzentration.....57

5, Kompetitionsstudien (125J-VIP und unmarkiertes VIP).....60

6, Sättigung der spezifischen Bindung.....63

7, Kompetitionsstudien (125J-VIP und verwandte Peptide).....66

V, Diskussion

1, Sind die Kriterien der Rezeptortheorie hier erfüllt?.....69

2, Zur Gewinnung der Zellen und zur Jodierung von VIP.....78

3, Methodendiskussion der Bindungsreaktion.....84

4, Aspekte der quantitativen Deutung.....87

5, Ergebnisse anderer VIP-Rezeptorbindungsstudien.....96

6, Überlegungen zur Funktion.....108

7, Klinische Aspekte und Ausblick.....112

VI, Zusammenfassung

Rezeptoren für VIP auf menschlichen T-Lymphozyten.....115

Literaturverzeichnis.....116

Abkürzungen.....134

Zusammensetzung verwendeter Lösungen.....135

Danksagungen.....137

Lebenslauf.....138

I, Einleitung

1, Peptide als Botenstoffe ("messenger")

Peptide sind kurze Polymere von Aminosäuren in typischer kovalenter Bindung, denen seit mehreren Jahren großes Interesse in der biologisch-medizinischen Forschung gilt. Dies ist vor allem in ihrer Rolle für die Kommunikation zwischen Zellen und zwischen Zellverbänden begründet. Laut einer aktuellen Hypothese läßt sich diese Funktion von ältesten Stufen der Phylogenese an verfolgen, wo Peptide zuerst als exkretorische Produkte von Einzellern an die Umwelt abgegeben wurden. Von dieser Rolle als interzelluläre Signale kann man eine Entwicklung bis hin zu neueren Erkenntnissen über Peptide als Hormone, Neurotransmitter und Neuromodulatoren konstruieren (150). Zur Illustration der großen Bedeutung von Peptiden seien verschiedene Entdeckungen der letzten Jahre aufgeführt. Mehrfach wurde die Wichtigkeit der Erkenntnisse durch Vergabe von Nobelpreisen unterstrichen (145).

1902 entdeckten BAYLISS und STARLING ein humorales Prinzip der Pankreas-Sekretion (Sekretin) und erarbeiteten daran den Begriff des Hormons. Sekretin wurde als Peptid erkannt und seine Sequenz entschlüsselt, nachdem SANGER am Hormon Insulin das maßgebliche Beispiel entwickelt hatte (Nobelpreis 1958).

Viele Hormone erwiesen sich als Peptide; so auch Steuerstoffe in Hypophyse und Hypothalamus (Oxytocin: DU VIGNEAUD, Nobelpreis 1955; Releasing Factors: GUILLEMIN/SCHALLY, Nobelpreis 1977). Peptide sind also auch "messenger" der Neurosekretion.

Zur Aktivierung intrazellulärer Vorgänge durch Peptidhormone erarbeitete SUTHERLAND grundlegende Vorstellungen am Studium von Glukagon (Rolle von cAMP: Nobelpreis 1971). Durch die Entwicklung des Radioimmunassays, zuerst für Insulin (BERSON/YALOW, Nobelpreis 1977), erfuhr die Forschung eine starke Beschleunigung.

Es gelang, die postulierten endogenen Opiate (Endorphine) nachzuweisen: auch sie sind Peptide (178).

Die Erkenntnis, daß einzelne Neurone sowohl über Peptide als auch über Amine als Neurotransmitter verfügen können, hat eine klassische neurobiologische Vorstellung ("Dale´s Prinzip": ein Neuron - ein Transmitter) erschüttert (114, 141).

Eine Neuformulierung der Konzepte interzellulärer Kommunikation ist im Gange, unterstützt durch die Entdeckung von bisher als Hormonen betrachteten Peptiden in Einzellern, bei denen der hergebrachte Hormonbegriff unsinnig ist (150).

Peptide des Gastrointestinaltrakts erhalten zur Zeit besondere Beachtung (7, 19, 21, 29, 43, 75, 79, 177). Von diesen dürften wohl Gastrin, Sekretin, Cholezystokinin-Pankreozymin und Somatostatin die bekanntesten sein. Sie sind aber nur ein kleiner, besonders prominenter Teil einer langen Liste; denn seitdem brauchbare Methoden der Isolation, Synthese, Messung und Lokalisation (Peptidchemie, HPLC, Radioimmunassay, Immunfluoreszenz) zur Verfügung stehen, werden laufend neue Peptide aus diesem "größten endokrinen Organ des Körpers" beschrieben (145).

Anstöße kommen aus klinischen Problemen (Genese der Ulkus-Krankheit)(42), aus der Physiologie (z.B. enteropankreatische Achse: Gibt es ein Insulin-freisetzendes Darmhormon?)(54), aus der Pathophysiologie mit dem Paradigma ektoper Hormonproduktion (klassisch: Zollinger-Ellison-Syndrom), zuletzt fruchtbar in der Identifizierung des langgesuchten Releasing Factors von Wachstumshormon (83), aus der Pharmakologie (Opiat-Wirkungen am Darm)(41), aus der vergleichenden Biologie (Phylogenese endokriner Systeme, Peptide der Froschhaut)(50, 59), aus der theoretischen Biologie (Konzepte des APUD-Systems, des Hormons, Neurotransmitters, Neuromodulators und der parakrinen Sekretion)(138, 150) und neuerdings aus der Biotechnologie (Peptidsequenzrekonstruktion aus der DNS-Analyse)(93, 122).
Besonders faszinierend ist, wie aufgrund des Vorkommens der Substanzen in verschiedenen Organsystemen neue Brücken zwischen Forschungsgebieten entstehen. Dies gilt vor allem für die Gastroenterologie, die Endokrinologie und die Neurowissenschaften (18). Man hat den Begriff der "gut-brain-peptides" geprägt und bearbeitet das neue Feld im Sinne des Pioniergeistes (Titel eines Symposiums: "Brain-Gut-Axis: The New Frontier")(7, 177).

Mit der Beschreibung neuer Krankheitsbilder (111, 160) und der Verfügbarkeit klinisch anwendbarer Meßmethoden (z.B. bei Hypergastrinämie)(87), mit der Verwendung von Pentagastrin zur Magensekretionsanalyse (166), von Ceruletid, einem CCK-Analogen, zur Gallenblasendiagnostik (158), den Versuchen, Somatostatin therapeutisch bei Pankreatitis (173) und wie Sekretin bei

gastrointestinalen Blutungen (176) einzusetzen, sowie durch die Suche nach Gastrin-Antagonisten zur Ulkus-Therapie (86) gewinnt das Gebiet der gastrointestinalen Peptide mehr und mehr Gewicht für die klinische Praxis.

2, VIP: Vorkommen, Sequenz, Funktion, Pathophysiologie

VIP oder Vasoaktives Intestinales Peptid (oder Polypeptid) hat sich als Name für eine zwischen 1967 und 1972 identifizierte Substanz eingebürgert, die zuerst aus Schweinedarm isoliert worden war (153, Monographie: 155). Mittlerweile ist das Interesse so groß, daß VIP 1983 zum zentralen Thema einer internationalen Tagung gemacht wurde (40). VIP ist mit fluoreszenz- bzw. radioimmunologischen Methoden in vielen menschlichen Organen nachweisbar: so in Gehirn (28), Darm (109), Pankreas (17), Schilddrüse (1) und Genitale (132, 139), wobei es wohl immer mit Nervengewebe assoziiert ist.

Seine Sequenz von 28 Aminosäuren wurde geklärt (121) und erlaubt es, VIP mit verschiedenen anderen Peptiden zu einer "Familie" zusammenzufassen. Dazu werden nach dem momentanen Stand Sekretin, Glukagon, GIP, VIP, PHI und Somatokrinin ("hpGRF") gerechnet (Aufzählung in Reihenfolge der Entdeckung)(83, 145). Auch Glicentin, ein "Proglukagon", kann dazugezählt werden (90), vielleicht auch "Prä-ProVIP" und "PHM", das mit nur 2 Sequenzunterschieden (Position 12: K statt R, 27: M statt I) das Korrelat von PHI beim Menschen zu sein scheint (93).

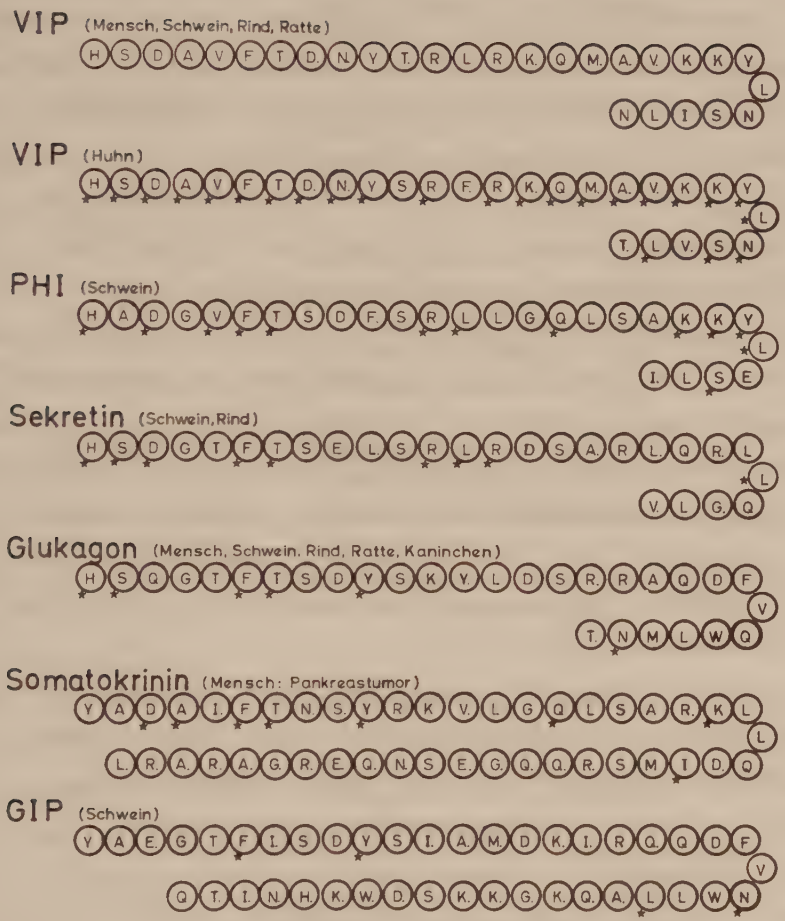

Abbildung 1

"Sekretin-Glukagon-Familie":

Aminosäuresequenzen von VIP und strukturähnlichen Peptiden

(In der "Familie" einzigartige Elemente: Punkt,

gemeinsame Elemente: Stern)

In Abbildung 1 sind die Peptide (N-Terminus links) nach dem Grad der "Verwandtschaft" mit VIP angeführt. Als Maß dafür gelten "homologe Aminosäuren", an gleicher Stelle auftretende identische Elemente, die in der Darstellung mit dem Stern hervorgehoben sind. Als Maß für Verschiedenheit sind (durch einen Punkt) dort auch Aminosäurereste markiert, die nur bei einem Peptid der "Familie" auftreten (Abb.1 nach 18, 34, 49, 50, 83, 97, 124, 168; Aminosäuren-Nomenklatur der IUPAC-Konvention nach 123).

Die physiologische Rolle von VIP ist erst in groben Umrissen geklärt: es scheint als "peptiderger" Überträgerstoff des vegetativen Nervensystems (im besonderen dessen non-adrenerger, non-cholinerger Komponente) zu fungieren (63, 67). Eine anfangs vermutete Rolle als Hormon hat sich nicht bestätigen lassen (157). Das Vorkommen von VIP in Plasma (und Liquor) wird als "Überlauf-Effekt" gedeutet und nicht als Station auf dem Weg zu einem Zielorgan (62, 157).

Studien in vitro und in vivo, an Versuchstieren und Versuchspersonen, haben Einflüsse auf eine Vielzahl von Organsystemen gezeigt. VIP wirkt unter anderem erweiternd auf Gefäße und führt zur Senkung des Blutdrucks. Dies waren die ersten beobachteten Wirkungen und sie dienten als (später namengebende) Kriterien zur Reindarstellung der Substanz (151, 152, 153). Auf molekularer Ebene wirkt VIP über die Stimulation der Adenylzyklase (vgl. Tab.6) und Aktivierung von Proteinkinase (82, 105). Weitere Wirkungen sind in Tabelle 1 aufgeführt, deren weites Spektrum freilich auch eine Reflexion der noch ungenauen physiologischen Kenntnisse ist.

Herz-Kreislauf-System	Gefäßerweiterung (Peripherie, Mesenterium, Gehirn, Koronarien), Blutdrucksenkung, mäßig positiv inotrope Wirkung
Respirationstrakt	Lungengefäßerweiterung, Bronchodilatation, gesteigerte Ventilation, Stimulation der Adenylzyklase
Verdauungsapparat	
Speicheldrüsen	Vermehrter Blutstrom
Ösophagus	Entspannung des unteren Sphinkters
Magen	Entspannung glatter Fundus-Muskulatur, Sekretionshemmung (Säure und Pepsin)
Pankreas	Sekretion von Wasser und Bikarbonat (Sekretin-ähnliche Wirkung)
Leber	Erhöhter Gallefluß
Gallenblase	Entspannung glatter Muskulatur, Hemmung der CCK-bedingten Kontraktion
Dünn- und Dickdarm	Entspannung glatter Kolonmuskulatur, Absorptionshemmung, Sekretion (Wasser und Ionen), Stimulation der Adenylzyklase
Endokrine Organe	
Pankreas	Freisetzung von Insulin, Glukagon, Somatostatin
Hypothalamus-Hypophyse	Freisetzung von Prolaktin, GH, LH, Hemmung der Somatostatin-Freisetzung
Nebenniere	ACTH-ähnliche Wirkung (Steroidsynthese, Adenylzyklase-Stimulation)
Nervensystem	Weckreaktion ("arousal"), Hyperthermie, Erregung von Neuronen (Cortex, Rückenmark), Stimulation der Adenylzyklase
Stoffwechsel	Lipolyse, Glykogenolyse, Hyperglykämie, Stimulation der Adenylzyklase (in Leber, Pankreas-Acini und Fettzellen)

Tabelle 1

Wirkungen von VIP; modifiziert nach Said (154)

Recht konkrete Vorstellungen gibt es bereits über die Rolle, die VIP im Wechselspiel mit Azetylcholin als Transmitter am Modellsystem der parasympathischen Innervation der Submandibulardrüse spielt (114); auch am Darm gilt VIP als Neurotransmitter von "non-adrenergen-non-cholinergen Effekten" (63, 67). Dort ist seine Wirkung auf Wasser- und Elektrolytsekretion bekannt, die nur bei Applikation auf die seröse Darmoberfläche auftritt (25, 69). Molekulare Grundlage dafür ist, daß VIP-Rezeptoren nur auf der vom Lumen abgewandten Seite der polar organisierten Darmepithelzellen vorkommen (47).

Klinische Bedeutung hat die Beschäftigung mit VIP dadurch gewonnen, daß sich bei Patienten mit dem Verner-Morrison-Syndrom (Leitsymptome: wäßrige Diarrhoe und Non-Beta-Zelltumor des Pankreas)(174) VIP im Tumor nachweisen ließ, und derartige Patienten bei weitem überhöhte Plasmaspiegel von VIP zeigten. Nach Tumorexzision fielen die Plasmaspiegel und zugleich verschwanden die Symptome (100). Auch wenn Details der Pathogenese des Verner-Morrison-Syndroms umstritten sind (96, 172), so deutet doch alles auf VIP als pathophysiologische Mediatorsubstanz (64, 100). Von manchen wird der Begriff "Vipom" für den Tumor und das damit verbundene Krankheitsbild propagiert. Er umfaßt dann auch Neoplasmen, die vom sympathischen Grenzstrang ihren Ausgang nehmen (112).

3, Eine Rolle für VIP in der Funktion zirkulierender Zellen?

VIP ließ sich in peritonealen Mastzellen nachweisen. Histaminliberatoren bewirkten an dieser Präparation eine Freisetzung sowohl von VIP als auch von Histamin. Ferner ließ sich VIP-Immunfluoreszenz außer in diesen Zellen auch in Mastzellen in Dünndarmschnitten nachweisen. Mastzellen im Lungengewebe zeigten auf Zytoplasma-Granula, den vermutlichen Speicherort von Histamin, beschränkte Immunfluoreszenz. All diese Befunde wurden an der Ratte erhoben (44).

Für menschliche Mastzellen gibt es indirekte Hinweise auf einen Gehalt an VIP. Der Fall eines Kindes mit Urticaria pigmentosa (vgl. 164) ist bekannt, bei dem sich aus der Mastzellen enthaltenden Hauteffloreszenz (Mastozytom) VIP-Immunreaktivität extrahieren ließ. Diese war im radioimmunologischen Verdünnungsversuch von natürlichem Schweine-VIP nicht unterscheidbar. Da das Kind keine meßbaren Histamin-Spiegel hatte, und der übernormal hohe VIP-Plasmaspiegel nach Exzision des Mastozytoms auf Normalwerte sank, spekulieren die Autoren über die Möglichkeit, daß die Symptome des Kindes - "flush" und Apnoe - durch VIP-Freisetzung verursacht wurden (181).

In den Labors von Dr. Sue und Tom O´Dorisio (Abteilungen für Hämatologie/Onkologie und Endokrinologie am Ohio State University Hospital in Columbus, Ohio, USA), in denen ein Großteil der vorliegenden Arbeit entstand, sind Messungen von VIP in Blutzellpopulationen normaler Blutspender vorgenommen worden. Dabei hatte sich ergeben, daß VIP nur in neutrophilen Granulozyten

enthalten ist. Im Mittel enthielten 10^8 Zellen 1,1 ± 0,6ng VIP-Immunreaktivität, während Thrombozyten, Erythrozyten, Lymphozyten und Monozyten davon frei waren (126, vgl. 120).
Daraus wurden zwei Schlußfolgerungen gezogen:
1, Die Bestimmung von VIP in Blutproben könnte als biochemischer "Marker" für Zellen der myeloischen Reihe in der klinischen Differentialdiagnose der Leukämien zur Anwendung kommen (65, 126).
2, Das in den Neutrophilen enthaltene VIP-immunreaktive Material könnte unter bestimmten physiologischen Bedingungen freigesetzt werden, um Wirkungen an anderen Zellen auszuüben.

Die zweite Hypothese wurde eingehender untersucht: Unter der Annahme, exogenes synthetisches VIP könne die Wirkung der gefundenen VIP-Immunreaktivität imitieren, wurde es an verschiedenen Blutzellpopulationen getestet. Untersucht wurde ein möglicher Effekt auf die Adenylzyklase. Die Aktivierung dieses Enzyms ist zur Zeit der einzig bekannte vermittelnde Mechanismus der VIP-Wirkung auf Zellen. Eine signifikante Aktivitätssteigerung durch VIP ließ sich nur für die Adenylzyklase von Lymphozyten zeigen. Das Enzym der neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Blutplättchen reagierte nicht. Die Reaktion scheint ferner nur für T-Lymphozyten, nicht aber für B-Lymphozyten spezifisch zu sein (127).
Unabhängig und von anderen Vorüberlegungen ausgehend, hat eine andere Arbeitsgruppe die Stimulation der cAMP-Produktion durch VIP an intakten menschlichen mononukleären Zellen beschrieben (80). Diese entsprechen einer Präparation von Monozyten und Lymphozyten.

4, Rezeptortheorie

Die gegenwärtigen Vorstellungen zur Aktivierung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) als intrazellulärem Botenstoff ("second messenger") postulieren, daß extrazelluläre Signalstoffe ("first messenger") wie Hormone oder Neurotransmitter mit zellmembranständigen Akzeptoren (Bindungsorten) eine Bindung eingehen. Gemeinsam bilden sie dann mit der ebenfalls membranständigen Adenylzyklase einen Rezeptorkomplex, der durch Synthese von cAMP die Übermittlung des Signals von extrazellulär nach intrazellulär bewirkt (Abb.2). Höchstwahrscheinlich ist noch ein regulierendes Membranprotein, das auf Guanin-Nucleotide reagiert, als Vermittler zwischen Bindungsort und Adenylzyklase geschaltet (10).

Die erfolgreiche Rekombination von Adenylzyklase und Bindungsort aus zwei verschiedenen Zellarten zu einem intakten Rezeptorkomplex hat das Rezeptorkonzept erhärtet (107). Dieser Versuch wurde mit Bindungsorten für VIP durchgeführt und spricht mit allen anderen Untersuchungen von VIP und Adenylzyklase für die Anwendbarkeit des Konzepts auf die Wirkung von VIP (vgl. Tab.1, 5 und 6).

In der umfangreichen Literatur über Rezeptorbindungsstudien sind genaue Kriterien definiert, die erfüllt sein müssen, um von Rezeptoren sprechen zu können (10, 14, 36, 98, 99, 119, 165). Die folgende, ausführlichere Darstellung sollte zum Verständnis der vorgelegten Untersuchungen hilfreich sein.

Der Begriff des Rezeptors ist, wie auch die Wortbildung andeutet, ein rein funktioneller Begriff [46]. Viele Einheiten der Biochemie sind über ihre Funktion definiert, am bekanntesten die Fermente (Enzyme). Bei diesen kann man bereits Fragen nach der Struktur beantworten. Es gelang die molekulare Analyse und die Synthese von Enzymen und viele Details zur Beziehung zwischen Struktur und Funktion sind bekannt [10]. Anders bei den Rezeptoren: eine vollständige molekulare Analyse ist noch für keinen Rezeptor geglückt. Sie scheinen zur Stoffklasse der Proteide (z.B. Glykoproteine) zu gehören. Am weitesten ist die stoffliche Charakterisierung für den Acetylcholin-Rezeptor gediehen, da er in spezialisierten Organen elektrischer Fische hochkonzentriert ist und leicht gewonnen werden kann. Es gelang die Isolierung von Untereinheiten und neuerdings sind Teile der Aminosäuresequenz entschlüsselt worden [56].
Hier wird der Rezeptorbegriff folgendermaßen gefaßt (nach 60):
Ein Rezeptor ist ein Zellbestandteil, der selektiv einen Liganden binden kann und dessen Bindungscharakteristik mit der Möglichkeit der Signalerzeugung, die eine Ereigniskette bis hin zur biologischen Antwort auslösen kann, konsistent ist.

Es sei angemerkt, daß es terminologisch insofern Unklarheiten gibt, als häufig der Bindungsort der extrazellulären Überträgersubstanz ("binding site", oder Akzeptor genannt) auch bereits als "Rezeptor" bezeichnet wird (vgl. Abb.3). Hier wird nur dann von Rezeptoren gesprochen, wenn auf die Bindungsreaktion folgende intrazelluläre Ereignisse nachweisbar sind (30, 60).

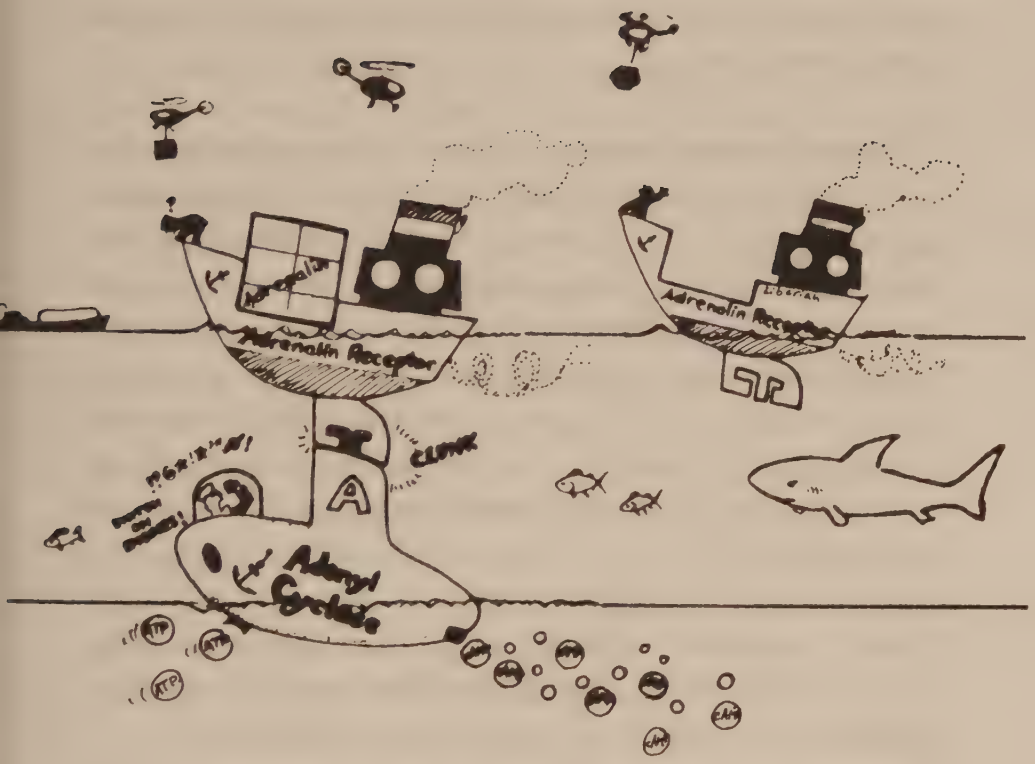

Abbildung 2

Vereinfachte Darstellung des Rezeptorkonzepts:

Ein extrazellulärer Ligand (hier Adrenalin) bindet an einen "Rezeptor" (begrifflich schärfer ist "Bindungsort") und löst ("Clunk") auf der intrazellulären Seite den enzymatischen Umbau von Adenosintriphosphat in cAMP aus (gezeichnet von TAB, aus 94).

Kahn (99) stellt folgende Identifikationskriterien für Peptidrezeptoren zusammen, wovon die ersten drei direkt aus der Rezeptordefinition ableitbar und die übrigen empirisch gewonnene Charakteristika sind.

A) Von einem bestimmten Rezeptor gibt es in einer Zellpräparation eine endliche Anzahl: er ist ein spezialisierter Zellbestandteil (z.B. im Bereich von 500 bis 250000 Rezeptoren einer Art pro Zelle). Daraus folgt, daß diese Einheiten bei genügend hoher Konzentration an Ligand alle gesättigt sein müssen. Diese Art der Bindung wird als spezifische Bindung an den Rezeptor von einer unspezifischen Bindungsart unterschieden. Letztere ist dadurch charakterisiert, daß sie im Bereich der verwendeten Konzentrationen an Ligand nicht zu sättigen ist.

B) Die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand ist selektiv: Folglich reagieren fremde Liganden mit dem Rezeptor entweder gar nicht oder nur in sehr abgeschwächter Weise (je nach ihrer molekularen Ähnlichkeit mit dem eigentlichen Liganden).

C) Bindungsverhalten und biologische Antwort korrelieren. Das heißt, die Bedingungen, unter denen der Ligand gebunden wird, und die, unter denen er die biologische Antwort auslöst, sind identisch. Abweichungen von diesen Bedingungen (z.B. Aktivitätseinschränkung durch Hitze, Enzyme oder Maskierung durch Antikörper) beeinflussen beide Reaktionen im gleichen Sinne. Umgekehrt bedeutet das auch: wenn chemisch mit dem eigentlichen Liganden verwandte Substanzen eine abgeschwächte

biologische Antwort auslösen, so sollte auch ihre Bindungsaffinität geringer sein.

D) Es erscheint sinnvoll, wenn die Nachricht "Signal an" in kurzer Zeit gegeben werden kann. Im Experiment läßt sich eine schnelle Bindung der Liganden beobachten. Bei Körpertemperatur erfolgt sie in Minuten, auf jeden Fall unter einer Stunde.

E) Ebenso sollte die Möglichkeit bestehen, das Signal rückgängig zu machen, "abzuschalten". Dazu lassen sich verschiedene Wege denken: Enzyme spalten den Liganden und/oder Rezeptor, oder die Komplexbildung ist durch Diffusion reversibel.

F) Das Signal sollte unter anderen Substanzen leicht zu erkennen und zu binden sein. Dazu paßt einerseits eine Art Schloß-Schlüssel-Beziehung, wie in B) ausgeführt, andererseits eine hohe biochemische Affinität zwischen Ligand und Rezeptor. Zur Analyse des Affinitätsverhaltens sind mathematische Modelle ähnlich denen der Enzymkinetik entwickelt worden (S.87-93). Neben dem einfachen Fall, in dem sich eine einzige Affinitätskonstante errechnen läßt, gibt es Fälle, in denen verschiedene Affinitätskonstanten auf die Existenz verschieden empfindlicher Unterklassen (oder Funktionszustände) von Rezeptoren hinweisen. In diesen letztgenannten Fällen kann man das Bindungsverhalten weiterhin nach positiv oder negativ kooperativem Verhalten der Unterklassen aufschlüsseln. Mit den genannten Modellen ist auch die Zahl der Rezeptoren (vgl.A) schätzbar.

G) Da das Signal von außen kommt, um intrazelluläre Prozesse auszulösen, erscheint das für Peptidrezeptoren als Paradigma geltende Modell von membranständigen Rezeptoren als sinnvoll. Die Grenze zwischen intra- und extrazellulär ist zugleich der "Signalknotenpunkt".

Wie für Glukagon exemplarisch gezeigt und an vielen anderen Systemen bestätigt, kann die Produktion des "second messenger", cAMP, über die Aktivierung der Adenylzyklase als erstes Glied einer Reaktionskette gelten, an deren Ende die, teilweise noch unbekannte, biologische Antwort steht. Die Details der Kopplung von Rezeptorbindung mit der Auslösung einer solchen Reaktionskette ("stimulus response coupling") sind selten geklärt (99). Ein Modell postuliert eine lineare Beziehung zwischen Rezeptorbesetzung und z.B. Adenylzyklase-Aktivität ("simple receptor occupancy theory"), ein anderes Modell vertritt eine nichtlineare Beziehung, bei der eine geringe Sättigung der Rezeptoren bereits eine starke Wirkung hat, während die große Zahl der übrigen, noch freien Rezeptoren durch ihre Besetzung die nur noch geringe Lücke zur Maximalwirkung schließen ("spare receptors"-Konzept).
Die biologische Antwort kann je nach System ganz unterschiedlich sein. Sie umfaßt die Generierung elektrischer Vorgänge (Substanz P, Azetylcholin), die Ausschüttung intrazellulär gespeicherter Substanzen (Releasing Factors, Glukagon), Transportvorgänge an Membranen (Insulin) oder trophische Einflüsse (Nerve Growth Factor).

II, Problemstellung

Wenn wir die Modellvorstellungen der Rezeptortheorie auf die Entdeckung der VIP-abhängigen Adenylzyklase in Lymphozytenmembranen (127) beziehen, läßt sich die Existenz von Bindungsorten für VIP auf Lymphozyten postulieren.
Diese Untersuchung stellt die Frage, ob die Existenzkriterien für Rezeptoren für VIP bei menschlichen T-Lymphozyten erfüllt sind. T-Lymphozyten wurden aufgrund der Vorbefunde einer unterschiedlichen VIP-Ansprechbarkeit der verschiedenen Lymphozyten (127) herausgegriffen, um an einer Subpopulation detailliertere Untersuchungen anzustellen. Eine ähnliche Problemstellung an mononukleären Blutzellen (d.h. Lymphozyten und Monozyten) konnte zum Vergleich dienen (80).

Die folgenden drei Fragen versuchen, die genannten Rezeptor-Kriterien (in Klammern angegeben) knapp zusammenzufassen:

1, Gibt es eine endliche Anzahl von Bindungsorten für VIP? (A)

2, Sind diese spezifisch für VIP? (B, C, F)

3, Machen die biochemischen Charakteristika der Bindungsreaktion sowohl eine Kopplung an Adenylzyklase als auch den Ablauf der Bindungsreaktion unter physiologischen Verhältnissen wahrscheinlich? (C, D, E, F)

Das methodische Vorgehen zur Beantwortung dieser Fragen, momentan das gebräuchlichste zur Prüfung der Existenz von Rezeptoren, sei mit einigen Formeln entwickelt.
In Symbolsprache läßt sich die Reaktion zwischen Rezeptor (R) und Ligand (L) so darstellen:

$$R + L \rightleftharpoons RL$$

RL ist der gebildete Komplex aus Rezeptor und Ligand.

Der Kunstgriff, um diese Reaktion meßbar zu machen, besteht in der Verwendung radioaktiv markierter Liganden (L*).
Somit:

$$R + L^* \rightleftharpoons RL^*$$

In Studien mit Liganden-ähnlichen Substanzen (X) gilt:

$$R + L^* + X \rightleftharpoons RL^* + RX$$

Ein Sonderfall dazu ist die Verwendung von unmarkiertem Liganden (L'). Es gilt:

$$R + L^* + L' \rightleftharpoons RL^* + RL'$$

Bekannt im vorliegenden System waren: R (die Konzentration der Rezeptoren bzw. T-Lymphozyten), L* (die Konzentration von radioaktivem VIP), RL* (der radioaktive Komplex von Rezeptor und Ligand), L' (unmarkiertes VIP) und X (GIP, Sekretin und Glukagon). Die zur Messung dieser Größen angewendeten Methoden werden im nächsten Kapitel dargestellt.

Mit Bezug auf die entwickelten Gleichungen und die Rezeptor-Kriterien kann man dieses Schema der nun folgenden experimentellen Studien aufstellen:

Experiment (Abb.)	Kriterium	Konstante	unabhängige Variable	abhängige Variable
Zeitverlauf (9, 10, 11)	D, E	R, L*	Dauer	RL*
enzymatischer Abbau (12)	E	L*	+R/-R	L*-Fragmente
Gewebelinearität (13)	A	L*	R	RL*
Kompetition mit unmarkiertem Liganden (14)	A, F	R, L*	L´	RL*, RL´
Sättigungsstudie (15)	A, F	R	L*	RL*
Kompetition mit ähnlichen Substanzen (16, 17)	B	R, L*	X	RL*, RX
cAMP-Studien (18, 19, 20)	C			

III, Methoden

1, Gewinnung der Lymphozyten

Im ersten Teil der Prozedur wurden mononukleäre Zellen aus dem Blut jeweils eines gesunden Spenders nach der leicht modifizierten Technik von Böyum (23) isoliert.

Etwa 500ml Blut wurden mit mehreren 50ml-Einmalspritzen (ca. 140x32mm, Nr.5663 von Becton, Dickinson and Co., Rutherford, New Jersey) aus einer Armvene entnommen und in einem großen, etwa 1,5l fassenden, sterilen Erlenmeyer-Kolben gesammelt. Zur Defibrinierung wurde von der ersten gesammelten Portion an der Kolben für etwa 15 Minuten fortlaufend geschwenkt, wodurch sich mit den, seinen Boden fast vollständig bedeckenden Glasbügelchen (aus "Soda Lime Glass", Durchmesser 6mm, Nr.6000 von Scientific Products, Obetz, Ohio) ein Gerinnsel-Klumpen bildet. Dieser Schritt bewirkt die Abtrennung von Fibrin und Thrombozyten. Anschließend wird das Blut im Erlenmeyer-Kolben im Verhältnis 1:3 mit der Salzlösung SBSS verdünnt. SBSS ist "Seligmann Balanced Salt Solution", deren Salzmischung (Formula No.78-0756; Zusammensetzung: S.135) von Gibco Labs, Grand Island, New York bezogen wurde.

Das so verdünnte Blut wird auf sterile 100ml-Zentrifugengläser (44x138mm, Pyrex Nr.8422 von Sorvall Inc., Newtown, Connecticut) verteilt, wobei es vorsichtig auf 30ml einer Ficoll(R)-Hypaque(R)-Lösung (s.S.135) am Boden des Glases geschichtet wird (durch Ablauf des verdünnten Blutes aus den

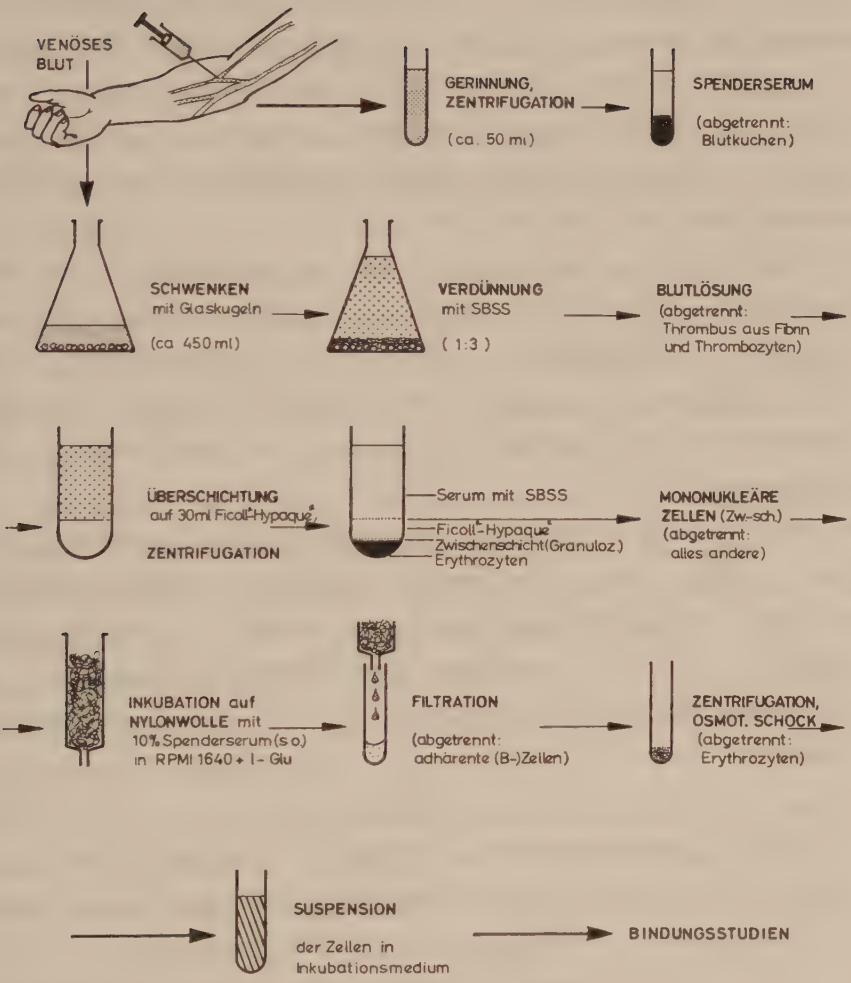

Abbildung 3

Gewinnung der Zellpopulation

wiederverwendeten 50ml-Spritzen, wobei Glas und Spritze in einem speziellen Gerüst ruhen, und die Spritzennadel so gekrümmt ist, daß das Blut langsam an der Wand des Gefäßes herabfließen kann). Die derart mit Blut gefüllten Zentrifugengläser werden mit einer Beschleunigung von 400g für 25 Minuten in einer Tischzentrifuge (GLC-1 von Sorvall) zentrifugiert, wodurch sich die zellulären Elemente gemäß ihrer Dichte verteilen.
Als Ergebnis dieses ersten Teils der Zellgewinnung finden wir mononukleäre Zellen als Grenzschicht zwischen dem nun zellfreien verdünnten Blutplasma und der Bodenschicht von Ficoll(R)-Hypaque(R). Ganz unten im Glas setzen sich die roten Blutkörperchen ab, oberflächlich bedeckt von einer Schicht von Granulozyten.
Die Mittelschicht der mononukleären Zellen wurde sorgfältig mit Hilfe einer kleinen Walzenpumpe aus den Zentrifugengläsern abgesaugt, das Aspirat noch einmal zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bodensatz der Gefäße, resuspendiert in Zellkulturlösung (s.S.23 und S.136), in einem Reagenzglas gesammelt.

Aus diesem Ausgangsmaterial wurden im zweiten Teil der Zellgewinnung Monozyten und B-Lymphozyten abgetrennt. Dazu wurde eine Modifikation herkömmlicher Techniken angewandt (57, 91). Nylon-Wolle aus Leukozyten-Filtern (Leuko-Pak(R) von Fenwal Laboratories, Deerfield, Illinois) wurde in destilliertem Wasser gespült, im Inkubator getrocknet und 400 bis 600mg davon locker in das Gehäuse von 10ml-Plastikspritzen (ca. 85x77mm, Nr.5604 von

Becton, Dickinson und Co.) gepackt. Diese "Trennsäulen" wurden bei feuchter Hitze sterilisiert und vor ihrer Verwendung mit der genannten Zellkulturlösung getränkt. Diese bestand aus "RPMI 1640 with L-Glutamine" (von Gibco, Zusammensetzung: 116, s.S.136), dem zehn Volumenprozent vom Serum des jeweiligen Blutspenders zugefügt worden waren. Die Lösung wurde stets mit einer Temperatur von 37°C verwendet.

Die mononukleären Zellen waren, wie geschildert, bereits in der Zellkulturlösung resuspendiert worden. Nun wurden jeweils 1ml-Fraktionen der Zellsuspension (ca. 50-80 Millionen Zellen pro ml) mit einer Glaspipette auf mehrere der vorbereiteten Trennsäulen verteilt. Dabei wurden die Zellen auf die Oberfläche der Nylonwolle am oberen, weiten Ende der in einem Halter senkrecht stehenden Plastikspritzen aufgebracht.

Es folgte eine halbstündige Inkubation der Trennsäulen im Wärmeschrank bei 37°C. Am Ende der Inkubationszeit wurden die nicht an den Nylonfasern haftenden Zellen mit pro Säule 40ml SBSS, dem 0,5% Humanalbumin (Buminate(R) 25% Albumin von Travenol) zugefügt war, ausgeschwemmt.

Die Zellen aus dem Eluat wurden nach einem Zentrifugationsschritt gesammelt und mehrmals einem osmotischen Schock in wenigen Tropfen destillierten Wassers ausgesetzt (beendet nach 1 bis 3 Sekunden durch die Zugabe von SBSS im Überschuß), um eventuell noch vorhandene Erythrozyten zu zerstören. Zum Abschluß der Präparationstechnik wurden die Zellen in dem für die Bindungsstudien verwendeten Inkubationsmedium (S.36 und Abb.6) resuspendiert und nach Zellzählung mit Hilfe eines Coulter

Counters (Model FN, Coulter Electronics Inc., Hialeah, Florida) auf die jeweils erwünschten Zellkonzentrationen verdünnt.

Die Zusammensetzung der gewonnenen Zellen wurde bei jeder einzelnen Präparation mit der Anfertigung eines Differentialblutbildes (Methylenblau-Färbung nach Wright mit Camco Quik Stain von Cambridge Chemical Products, Ft. Lauderdale, Florida; Zusammensetzung: S.135) und der Darstellung von IgG-tragenden Zellen durch einen fluoreszierenden Antikörper ($F(ab')_2$-Fragment von Ziegen-Antihuman-Globulinen, konjugiert mit Fluoreszeinisothiozyanat; Kallestad, Chaska, Minnesota) überprüft (144). Monoklonale Lymphozyten-Antikörper konnten als Kontrolle zur Charakterisierung der Zellen erst nach Abschluß der hier dargestellten Experimente angewendet werden (s.S.80).

Die Nichtanfärbbarkeit von Zellen mit Trypan-Blau (Lösung von Gibco) wurde als Kriterium ihrer Lebensfähigkeit angesehen (66).

Die Ergebnisse für die in den hier dargestellten Experimenten verwendeten Zellpräparationen sind in Tabelle 2 angeführt.

In Vorversuchen war die Verunreinigung der Zellpräparation mit IgG-tragenden Zellen mit zwischen 1 und 15 auf 100 Leukozyten bestimmt worden. Stichprobenweise ergaben sich in den Präparationen der hier dargestellten Versuche Werte zwischen 1 und 4 (Spender F.P., A.D., R.K., L.V.).

Spender/Abb.	Differentialblutbild der isol. Leukozyten				Kontamination		Vitalität
	Segmentkernige (%)	Monozyten (%)	Lymphozyten (%)	IgG-positiv (%)	"Schatten" (auf 100 Leukoz.)	Erythrozyten (auf 100 Leukoz.)	Trypan-Blau-negativ (%)
J.G. m / 7	0	5	95	n.b.	(35)	(67)	90
D.F. m / 7	1	9	90	n.b.	1	2	85
L.V. w / 7	1	3	96	4	0	45	98
F.P. m / 8	6	1	99	1	(41)	(8)	75
D.K. m / 9	16	2	82	n.b.	7	2	92
S.T. m / 9	10	5	85	n.b.	0	0	91
L.S. w / 10	1	1	98	n.b.	0	10	94
J.A. m / 12	0	1	99	n.b.	15	3	85
T.C. m / 13	1	2	97	n.b.	(3)	(10)	77
R.K. m / 14	5	3	92	3	1	11	93
L.B. w / 14	3	7	90	n.b.	3	9	94
A.D. m / 14	10	3	87	2	6	0	85
J.M. w / 15	2	0	98	n.b.	0	3	91
E.M. w / 16	1	1	98	n.b.	2	10	92
T.C. m / 17	0	4	96	n.b.	5	10	98
B.F. m / -	0	2	98	n.b.	5	20	92
A.G. m / -	1	1	98	n.b.	2	3	85

m: männlich
w: weiblich

Tabelle 2

Charakterisierung der Zellpopulation

(Werte in Klammern sind vor osmotischem Schock bestimmt.)

2, Radioaktive Markierung von VIP

VIP wurde nach der Chloramin T-Methode (78) mit radioaktivem Jod markiert, wobei zuerst radioaktives Natriumjodid mit Chloramin T oxidiert wird. Das entstehende freie Jod kann dann mit Aminosäureresten spontan eine Bindung eingehen, wobei im Falle von VIP die Reste in Position 1 (Histidin), 10 (Tyrosin), 17 (Methionin) und 22 (Tyrosin) in Frage kommen. Da Histidin und Tyrosin maximal zwei Jodatome binden können, könnte VIP insgesamt sieben radioaktive Jod-Atome tragen (31); wie aber in der Literatur gezeigt ist, dürfte der Großteil (97%) der Jodverbindungen mit Tyrosin-Resten entstehen (46). Natriummetabisulfit ($Na_2S_2O_5$) reduziert schließlich wieder die Reaktionsteilnehmer.

In Portionen von 1,6µg in Glasampullen lyophilisiertes VIP (synthetisiert von Peninsula Laboratories, San Carlos, California) wurde mit 75µl 0,05N Essigsäure gelöst und in das als Reaktionsgefäß benützte Transportglas mit 125J (als NaJ mit 1mCi in 10µl, von The Radiochemical Centre, Amersham, England) pipettiert.
Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10µl der Chloramin T-Lösung (Chloramin T=Tosylchloramin-Natrium von Eastman Chemical, Rochester, New York) gestartet und nach 20 Sekunden, während derer das Reaktionsgefäß sachte in der Horizontalen geschwenkt wurde, durch die Zugabe von 100µl einer Lösung von Natriummetabisulfit (von Mallinckrodt) beendet. (Beide Lösungen müssen wegen ihrer

geringen Beständigkeit unmittelbar vor Verwendung zubereitet werden: S.135.)

Nach Ablauf einer kurzen Wartezeit von etwa 1 Minute zur Beendigung der Reaktion wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes auf eine Trennsäule übertragen, die aus einer Glaspipette von 1cm Durchmesser durch Einfüllen von Zellulosepulver (CF-1 Cellulose von Whatman) bis auf eine Höhe von 10cm hergestellt worden war.

Mit zwei verschiedenen Puffern, die unter Zuhilfenahme von Luftdruck durch diese Zellulose-Säule gespült und in Milliliter-Fraktionen aufgefangen werden, soll die Trennung der Reaktionsprodukte, vor allem des freien radioaktiven Natriumjodids und des radioaktiv markierten VIP, erzielt werden. Zuerst wird mit 20ml (in 3-4 Portionen) 0,2molarem Glyzin von pH 8,8 (mit NaOH eingestellt) gespült, anschließend 20-30mal mit je 1ml des zweiten Puffers (aus 5ml von, zur Entfernung von endogenem VIP an Holzkohle absorbiertem, menschlichen Blutplasma und 45ml 0,2N Essigsäure). Man erhält 25 bis 35 Fraktionen, die ersten vier mit etwa je 5ml; die übrigen sind 1ml-Fraktionen.

Im nächsten Schritt der Prozedur werden die Fraktionen genauer charakterisiert. Dazu wurde ihre Radioaktivität in einem Gammazähler (Scintillation Spectrometer Autogamma 5110 von Packard; Zählrate 65%) bestimmt (Messung jeweils einer 10µl-Probe) und ihre Eigenschaft, mit einem Antikörper gegen VIP reagieren zu können (S.33). Dies läßt einen Rückschluß auf den relativen Gehalt der Fraktionen an durch die Jodierung vermutlich unbeschädigtem Peptid zu. Ein typisches Ergebnis ist in Abbildung 4 wiedergegeben.

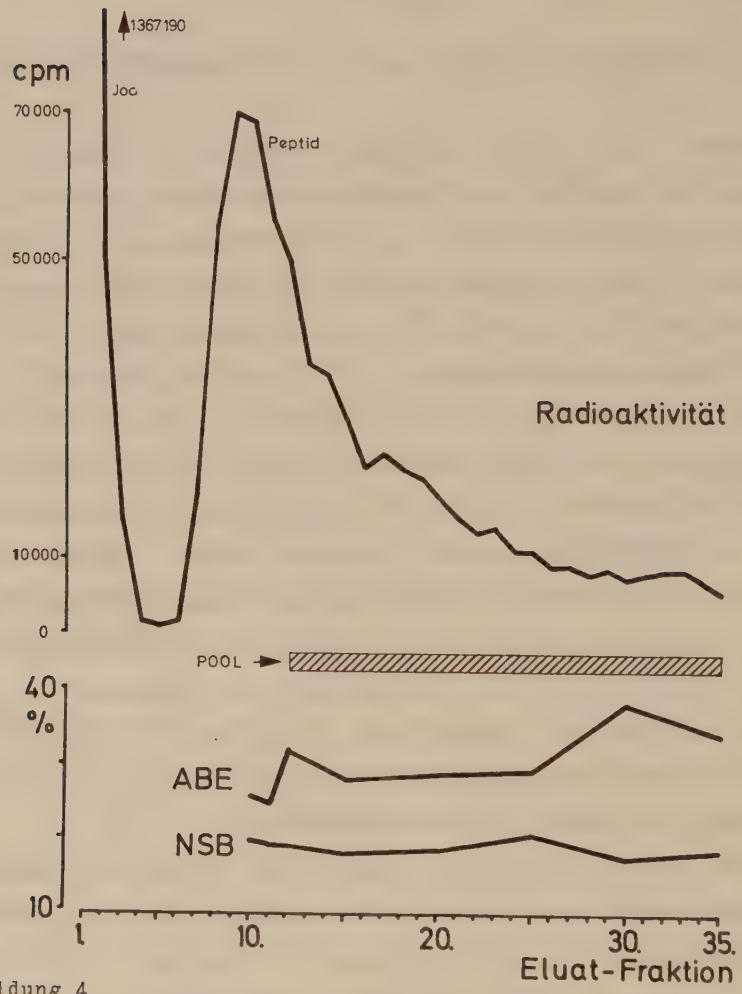

Abbildung 4

Charakterisierung der von der Trennsäule gesammelten Fraktionen von VIP, nach Reaktion mit radioaktivem Natriumjodid: aufgrund Radioaktivität der Fraktionen und aufgrund ihrer Reaktion mit VIP-Antikörper

(ABE: Wirksamkeit des Antikörpers, NSB: unspezifische Bindung)

Gemäß dieser Charakterisierungsdaten wurden dann die Fraktionen des Reaktionsprodukts ausgewählt, die, vereinigt zu einem "Pool", als radioaktiv markiertes VIP in Bindungsstudien verwendet wurden. Ausgewählt wurden die Fraktionen mit möglichst hoher Radioaktivität bei Anwesenheit und hoher Intaktheit des Peptids. Die resultierenden "Pools" waren für 4-5 Bindungsexperimente ausreichend.

3, VIP-Radioimmunassay und Bestimmung der spezifischen Aktivität

Methoden eines Radioimmunassays für VIP (nach T.O´Dorisio)(70, 130) wurden angewendet, um stichprobenweise die Konzentration von VIP in den Bindungsstudien zu kontrollieren, ferner um die Fraktionen jodierten VIPs hinsichtlich ihrer immunologischen Bindungsfähigkeit zu charakterisieren und um die spezifische Aktivität von jodiertem VIP zu bestimmen.

Beim regulären Radioimmunassay wird die Konzentration an radioaktiv markierter Substanz ("tracer") konstant gehalten. In parallelen Ansätzen steht zusätzlich vorhandene nicht-radioaktive gleiche Substanz bekannter Konzentration in Kompetition um die Bindung der Substanz an spezifische Antikörper. In einer so gewonnenen Eichkurve lassen sich Werte, die sich bei Reaktion von "tracer" und einer unbekannten Konzentration der Substanz mit dem Antikörper ergeben, aufsuchen; damit können unbekannte Konzentrationen an bekannten gemessen werden.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität nach der Methode des "self-displacement" (95) wird eine solche Eichkurve benötigt, ferner wird die Reaktion zwischen Antikörper und verschiedenen Konzentrationen an radioaktiver Substanz graphisch dargestellt. Aus dem Vergleich der Kurven kann einer bestimmten Radioaktivität eine bestimmte Menge an Substanz zugeordnet werden, entsprechend der Definition von spezifischer Aktivität als Verhältniszahl von Radioaktivität zu Masse bzw. Menge der Substanz (Einheit: Ci/g oder Ci/mol).

Der verwendete Antikörper (Calbiochem No.674) stammte von weißen Neuseeland-Kaninchen, denen synthetisches Schweine-VIP (182) als Antigen subcutan injiziert worden war. Nach Angaben von O´Dorisio (130) ist der damit aufgebaute Radioimmunassay, bei dem die Trennung von gebundener von freier Radioaktivität mit einem zweiten Antikörper stattfindet, bis auf 5pg/ml VIP empfindlich und zeigt keine Kreuzreaktion mit den teilweise verwandten Peptiden Calcitonin (Mensch), Cholezystokinin, Sekretin, GIP, Glukagon, Gastrin, Pankreatisches Polypeptid (Rind) - jeweils bis zu einer Menge von 10ng dieser Peptide.
Zur Erstellung der Eichkurve wurden die erforderlichen Reaktionsbestandteile in 12x75mm Reagenzgläser pipettiert, wobei jeweils Dreifach-Ansätze vorbereitet wurden.
Neben den Reagenzgläsern mit steigenden Konzentrationen an unmarkiertem VIP, beginnend bei 0 (Standard- bzw. Eichkurve), wurden Kontrollen für die Gesamtmenge der zugeführten Radioaktivität und für die unspezifisch gebundene Radioaktivität

Reagenzglas	Schritt I					II	III
Gesamtradioaktivität	-	-	-	-	-	100	-
Unspezifische Bindung	600	100	100	-	-	100	100
Maximale Bindung (VIP=0)	500	100	100	-	100	100	100
VIP-Standards (anwesende VIP-Masse in pg)							
2	400	100	100	100	100	100	100
5	400	100	100	100	100	100	100
10	400	100	100	100	100	100	100
25	400	100	100	100	100	100	100
75	400	100	100	100	100	100	100
100	400	100	100	100	100	100	100
200	400	100	100	100	100	100	100
	verdünntes Kaninchenserum (2%)	0,1M EDTA	Aprotinin 50%	VIP-Verdünnungsreihe (2-200 pg/µl)	VIP-Antikörper (No.674)	^{125}J-VIP	Anti-Kaninchen-Antiserum

Tabelle 3

Pipettierplan für die Eichkurve des VIP-Radioimmunassays

(Angaben in µl, Reagentien: S.136)

(bedingt durch nicht-immunologische Bindung und Niederschlag durch den zweiten Antikörper) vorbereitet.

Im ersten Schritt wurden die in Tabelle 2 genannten Reaktionsbestandteile pipettiert, in den Reagenzgläsern mit einem Rüttler vermischt und im Kühlschrank bei 4°C für 24 Stunden inkubiert. Im zweiten Schritt wurde das radioaktiv markierte VIP zugegeben, gerüttelt und weiter im Kühlschrank inkubiert.

Nach 20 Stunden folgte dann der dritte Schritt, wieder mit Rüttlung und Inkubation. Nach weiteren 18 Stunden werden alle Reagenzgläser, bis auf die Kontrollen der Gesamtradioaktivität, in einer Gefrierzentrifuge (General Purpose Centrifuge RC-3 von Sorvall, 2000U/min) bei 4°C für eine halbe Stunde zentrifugiert, wodurch am Boden der Gefäße ein opaker Niederschlag von Immunkomplexen sichtbar wird. Der Überstand wird verworfen, auf Trockenheit der Reagenzgläser geachtet und im "Autogamma 5110" die Radioaktivität jedes einzelnen Glases gemessen.

Die Werte werden, durch Subtraktion der unspezifischen Bindung, als spezifisch gebundene Radioaktivität ausgedrückt und auf halblogarithmischem Papier als Prozent der maximal gebundenen Radioaktivität gegen die Konzentration von VIP in der Probe aus der Verdünnungsreihe aufgetragen (Standard- oder Eichkurve, s.Abb.5).

Die widersprüchlichen Angaben (45, 70, 130) über die Nachweisgrenze des Assays (5pg/ml bzw. 50pg/ml) dürften sich so aufklären lassen, daß der Assay zwar noch 5pg VIP in dem einen Milliliter der Inkubatlösung messen kann, daß er aber, da das Volumen in der VIP-Verdünnungsreihe bzw. der unbekannten

VIP-Lösung nur ein Zehntel dieses Endvolumens beträgt, letztlich nur noch 5pg, stammend aus 100ul, somit eine Probe mit 50pg/ml erfaßt.

Zur Bestimmung der Qualität von 125J-VIP werden für mehrere Fraktionen des jodierten Reaktionsproduktes vom Pipettierplan (Tab.3) nur die ersten drei horizontalen Zeilen ausgeführt.

Das Verhältnis von unspezifischer Bindung bzw. maximaler Bindung zur Gesamtradioaktivität ist das Qualitätskriterium, wobei auf einen niedrigen Betrag des ersteren Quotienten (NSB="nonspecific binding") bei einem hohen Betrag des letzteren (ABE="antibody binding efficiency") Wert gelegt wird, weil dies als Hinweis für immunologische Intaktheit gelten kann (Abb.4).

Auch das Vorgehen zur Erstellung der zweiten Kurve für die Bestimmung der spezifischen Aktivität läßt sich am angegebenen Pipettierplan erläutern. Dazu werden auch wiederum nur die ersten drei Zeilen ausgeführt, von diesen aber so viele Reagenzgläser vorbereitet, wie dann beim zweiten Schritt Verdünnungen von 125J-VIP aus einer 1:2 Reihe vorliegen. Es werden z.B. 240000cpm, 120000cpm usw. an Gesamtradioaktivität zugeführt. Die Kurve ergibt sich dann aus dem Quotienten von gebundener und freier Radioaktivität (B/F), aufgetragen gegen die Gesamtradioaktivität (Abb.5).

Der Vergleich der beiden Kurven erlaubt es, den Werten der Eichkurve die Werte der Selbsthemmungskurve graphisch zuzuordnen. Am zweckmäßigsten geschieht dies für die Werte an Radioaktivität und Masse, die zur Erreichung halbmaximaler Hemmung des Anfangsquotienten B/F nötig sind.

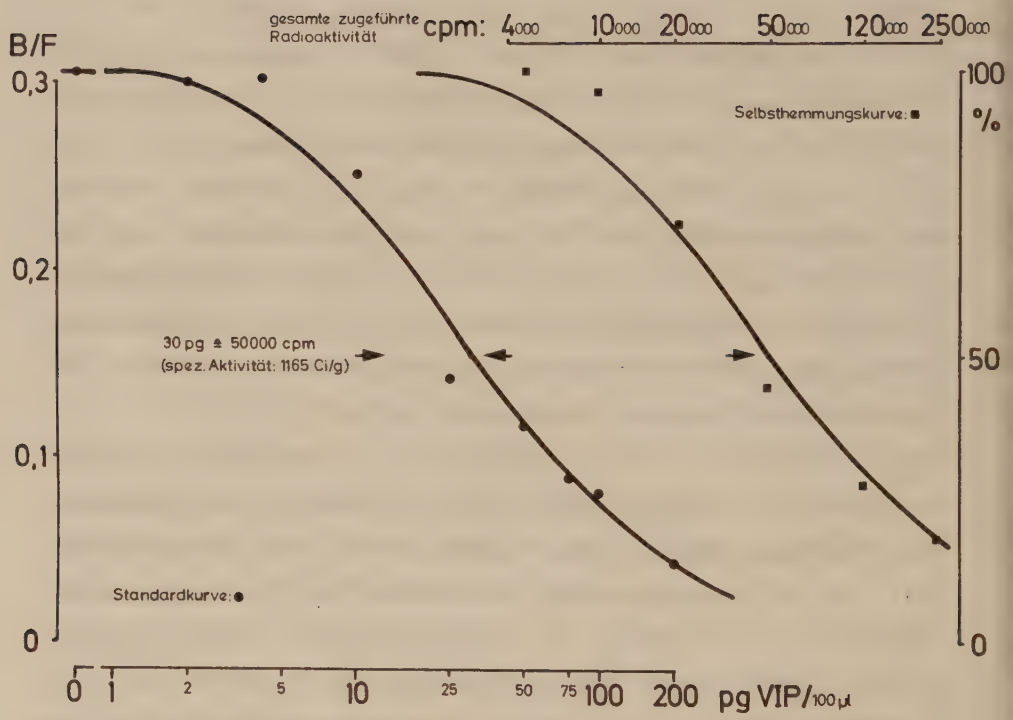

Abbildung 5

Bestimmung der spezifischen Aktivität von 125J-VIP

1, Standardkurve (mit T = 4823)

n	0	2	5	10	25	50	75	100	200
B_n	1609	1592	1603	1410	1003	909	808	778	642
B/F	0,303	0,300	0,303	0,251	0,141	0,116	0,088	0,080	0,043

2, Selbsthemmungskurve

T	245853	121054	50288	21179	9761	4823
NSB	24174	11686	4994	2176	985	482
B_0	36693	21259	11199	6048	3171	1609
B/F	0,056	0,085	0,137	0,224	0,294	0,305

Tabelle 4

Wertetabelle zu den Graphen der Abbildung 5

(Zahlen sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen in cpm; Autogamma 5110: 1cpm = 0,65dpm)

Formeln:

$B/F = SB/(T-SB)$ $\qquad SB_n = B_n - NSB$

Abkürzungen:

T: Gesamtradioaktivität

n: VIP in pg/100µl

B_n: Bindung bei verschiedenen VIP-Konzentrationen

B/F: Quotient von gebundener und freier Radioaktivität

NSB: unspezifische Bindung

B_0: maximale Bindung (ohne unmarkiertes VIP)

SB: spezifische Bindung

Diese Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde bei jedem einzelnen "Pool" radioaktiv markierten VIPs vorgenommen. Dabei gab es beträchtliche Schwankungen von "Pool" zu "Pool", was unter anderem an der Zahl der enthaltenen Fraktionen und an geringfügigen Variationen in den Reaktionsbedingungen (Zeitdauer, Inhomogenität im Reaktionsgefäß), mit nachfolgender größerer Beschädigung des Peptids, gelegen haben dürfte. Der für jeden "Pool" charakteristische Wert wurde den Berechnungen in den damit durchgeführten Experimenten zugrundegelegt. Mittelwert ist 705Ci/g gleich 1,16 Atome 125J pro Molekül VIP (Details S.81-83).

4, Bindungsstudien

Unter Standardbedingungen (in Experimenten der Abb. 9, 14, 15, 17 und bei Spender A.G.) wurden die Inkubationen in durch Filtration sterilisiertem Zellkulturmedium "RPMI 1640 with L-Glutamine" (S.136) durchgeführt, dem als Puffer 50mM Hepes (N-2-Hydroxyäthyl-N´-2-äthansulfonsäure von Sigma, St.Louis, Missouri)(163) beigefügt war, adjustiert an einen pH von 7,4 mit NaOH. (In den übrigen Experimenten wurde 100mM Hepes NaOH pH7,4 verwendet, wodurch sich aber die spezifische Bindung nicht ändert, wie an den Spendern J.G. und D.F. gezeigt werden konnte.) Ferner enthielt das Medium 0,5% menschliches Serumalbumin (aus 25% Stammlösung Buminate(R), S.23) zur Verminderung der unspezifischen Bindung.

Je nach Experiment waren in den Inkubationsgefäßen (aus Plastik, von KEW Scientific, Columbus, Ohio; maximaler Inhalt 0,5ml, in Vorversuchen - Abb.7 und 8 - auch 1,5ml) markiertes VIP, unmarkiertes VIP (von Peninsula, San Carlos, California), GIP (hochgereinigtes natürliches Material, Reinheitsstufe IV, von Prof. John Brown, Vancouver, Canada; vgl. 26), Sekretin (synthetisch, Sequenz wie beim Schwein; von Peninsula), Glukagon (Extrakt aus Schweine- und Rinderpankreas; von Sigma) und Bacitracin (Sigma) in verschiedenen Konzentrationen enthalten. Reaktionsvolumen war in den Vorversuchen 0,3 und 0,5ml (Experimente der Abb.7 und 8), danach stets 0,2ml.

Die Zellsuspension (S.20-25 und Abb.3) war, wie erwähnt, mit Inkubationsmedium auf die jeweils erwünschten Werte verdünnt worden. Ihre Zugabe in die Reaktionsgefäße bedeutete den Startpunkt der Reaktion, während deren Ablauf die Gefäße in einem Wasserbad bei wählbarer Temperatur mechanisch in Bewegung gehalten wurden (Dubnoff shaking incubator von Precision, Chicago, Illinois).

In Übereinstimmung mit den meisten anderen VIP-Bindungsstudien (s.Tab.5) wurde zur Trennung der Zellen ein Zentrifugationsverfahren angewendet. Am Ende der jeweiligen Reaktionszeit wurden rasch 0,2ml eiskaltes Inkubationsmedium in die Gefäße pipettiert (0,7-0,8ml in Vorversuchen), die sofort bei ca. 9000g in einer Mikrozentrifuge eine Minute lang zentrifugiert wurden (Microfuge B, Beckman Instruments Inc., Irvine, California). Mit einer Glaspipette und dem Sog einer Vakuum-Leitung wurde der Überstand rasch, aber unter möglichster

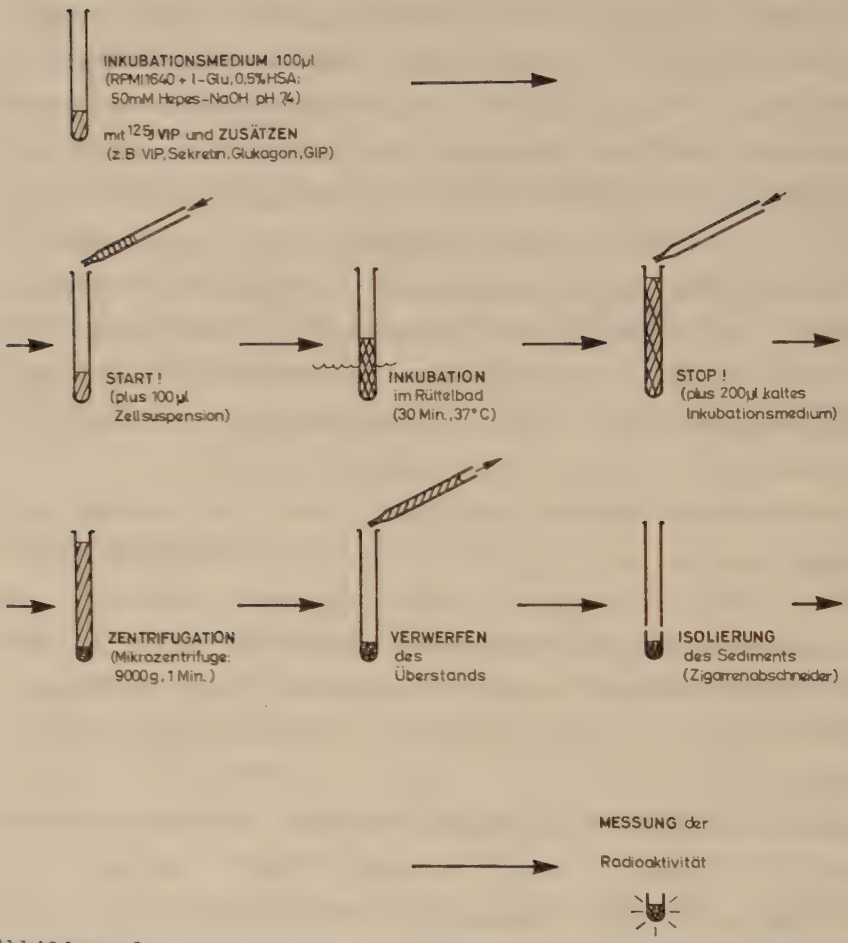

Abbildung 6

Bindungsstudien unter Standardbedingungen (Experimente der Abb.14)

Modifikationen:

100mM Hepes in Abb.10, 12, 13 und 16;

Variable Inkubationszeiten in Abb.9 und 10;

45 Minuten Inkubation: Abb.13, 15, 16, 17 und bei A.G.

Schonung des Sediments abgesaugt und die Böden der Plastikgefäße mit einem Zigarrenabschneider (No.5651 von Pfeilring, Solingen) abgetrennt. In einem Gamma-Zähler (Beckman Gamma 7000; Zählrate: 81%) wurden diese, die Zellen tragenden Abschnitte auf die in ihnen gebundene Radioaktivität an 125J gemessen. Jeder einzelne Wert aus Bindungsstudien war als Zwei- oder Dreifachbestimmung angesetzt, woraus meist Mittelwerte gebildet wurden.

Spezifische Bindung, wie sie im Ergebnisteil angegeben ist, ist definiert als die Differenz der beiden Mittelwerte aus der Bestimmung der gesamten gebundenen Radioaktivität und der Bestimmung der dann gebundenen Radioaktivität, wenn unmarkiertes VIP im Überschuß (mindestens 100mal mehr als markiertes VIP) im Reaktionsgefäß vorhanden war (siehe Abb.14 zur Erläuterung).

5, Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie von 125J-VIP wurden Anasil-C-Platten (Schichtdicke 250µm, Größe 20x20cm, unterteilt in 2cm breite parallele Streifen; von Analabs, North Haven, Connecticut) in verschließbaren, ca. 20x20x10cm großen Glasgefäßen verwendet. Deren Boden war mit einer etwa 1cm hohen Schicht des Lösungsmittels 1-Butanol - Pyridin - Essigsäure - Wasser im Verhältnis 15:10:3:12 (nach 22) bedeckt. Wenn das Lösungsmittel die gesamte Platte durchwandert hatte, wurde diese aus dem Gefäß genommen, die Wanderungsstrecke in Teilstücke von

1cm unterteilt und mit Hilfe eines Skalpells die Kieselgel-Schicht Teilstück für Teilstück (also je $2cm^2$) abgeschabt und fraktioniert in Reagenzgläsern gesammelt. Die Radioaktivität in den Gläsern wurde mit einem Beckman Gamma 7000 gemessen (Abb.12).

6, Quantitative Auswertung

In die Berechnungen gingen, wie jeweils angegeben, einzelne Meßwerte oder Mittelwerte von Mehrfachbestimmungen ein. Sie wurden mit einem programmierbaren Taschenrechner durchgeführt, der über feste Programme zur Errechnung von Mittelwert, Standardabweichungen und linearen Regressionen verfügt (TI 55II von Texas Instruments).

Zur Auswertung der Sättigungs- und Kompetitionsstudien wurde der Rechner gemäß den angegebenen Formeln (S.91-94) programmiert.

Differenzen zu den bereits publizierten Daten dieser Studie erklären sich daraus, daß die Berechnungen dort mit Programmen zur Kurvenanpassung auf einer Großrechenanlage durchgeführt wurden (45).

IV, Ergebnisse

1, Vorversuche: Festlegung der Reaktionsbedingungen

Zur Trennung des Komplexes von Rezeptor und Ligand von den übrigen Reaktionsteilnehmern einer Bindungsreaktion werden vor allem zwei Verfahren angewendet (58): Filtration und Zentrifugation.
Anfangs wurde mit Filtersystemen experimentiert, wobei sich große Schwierigkeiten zum einen durch die Unhandlichkeit der Methode ergaben; maximal konnten drei Inkubate gleichzeitig filtriert werden. Zum anderen bestätigte sich die Tatsache, daß Peptide leicht an Oberflächen haften bleiben ("stickiness")(31), was sich daran zeigte, daß je nach Filter-Fabrikat um 50% der zugesetzten Radioaktivität auf den Filtern meßbar war, ohne daß sich überhaupt Zellen im Inkubat befunden hatten ("no tissue blank" = Kontrollansatz ohne Zellen). Dieser hohe Ausgangswert würde natürlich die Interpretation jeder zusätzlich auf den Filtern befindlichen Radioaktivität, nun aber bedingt durch die Bindung an die nicht filtrierbaren Zellen, erschweren oder sogar unmöglich machen.
Demgegenüber ist die Technik mit der Kleinzentrifuge handlich (48 0,5ml-Plastikgläschen können gleichzeitig zentrifugiert werden) und die Radioaktivität in den Gefäßböden bei Kontrollansätzen ohne Zellen ("no tissue blank") ist minimal (0,5 bis 2% der zugesetzten Radioaktivität)(vgl. Abb.13, 16, 17).

Aus weiteren Vorversuchen wurde klar, daß im Überschuß zugesetztes

unmarkiertes VIP (ca. 100- bis 1000fache Konzentration des 125J-VIP) die mit den Zellen zentrifugierte Radioaktivität senken kann, es also eine Kompetition oder eine gegenseitige Verdrängung zwischen 125J-VIP und VIP gibt. Dies ist ein erster Hinweis auf die Möglichkeit, daß 125J-VIP spezifisch gebunden wird, wobei spezifische Bindung als Differenz zwischen der mit den Zellen zentrifugierten Radioaktivität bei Abwesenheit und bei Zusatz von unmarkiertem VIP im Überschuß definiert ist (58, 98).

Um diese spezifische Bindung genauer untersuchen zu können, war das erste Ziel, die Reaktionsbedingungen so festzulegen, daß einerseits die spezifische Bindung hoch (10% der gesamten zugesetzten Radioaktivität ist ein empfohlener Wert)(30), andererseits die Abweichung von physiologischen Bedingungen gering war.
Zur Festlegung der Reaktionsbedingungen wurde der Einfluß von Pufferkonzentration, pH, von Albumin und Bacitracin, sowie der Inkubationstemperatur untersucht.

Zum Einfluß von pH und Albumin sind die Ergebnisse zweier Versuche in Abbildung 7 oben dargestellt. Willkürlich waren eine Inkubationszeit von 30 Minuten und eine Inkubationstemperatur von 37°C gewählt worden. (Inkubation in 0,3ml Puffer mit 100mM Hepes, 10 U/ml Bacitracin, 38nM unmarkiertes VIP in der Hälfte der Inkubate zur Unterscheidung von gesamter und spezifischer Bindung, Stop mit 0,7ml eiskaltem Puffer, Zentrifugation 2 Minuten; Spender J.G.: je $1{,}25 \times 10^6$ Zellen, 22462 ± 51cpm, also ca. 139pM

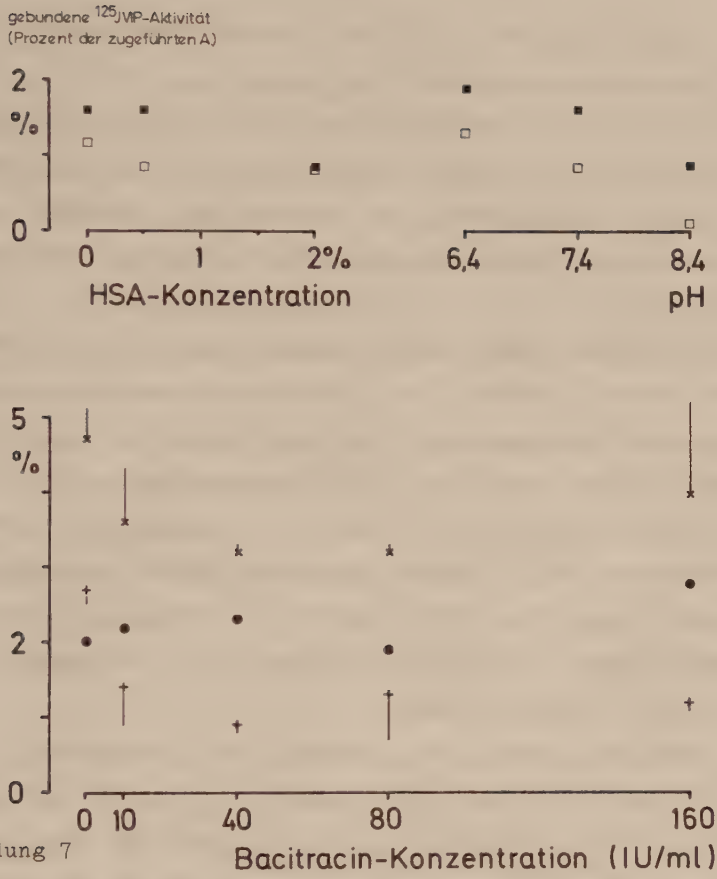

Abbildung 7

Oben: Einfluß von Albuminkonzentration und pH auf die spezifische Bindung von 125J-VIP an isolierte T-Lymphozyten zweier Blutspender (J.G. ■ , D.F. □)

Unten: Einfluß der Bacitracin-Konzentration auf die Bindung (Spender L.V.)

gesamte gebundene Aktivität x

unspezifische Bindung + (gebundene Aktivität mit 60nM VIP)

spezifische Bindung • (Differenz von x und +)

(Mittelwerte und einfache Standardabweichung von Dreifachbestimmungen)

125J-VIP; D.F.: je $1{,}65 \times 10^6$ Zellen, 35449 ± 937cpm, ca. 219pM 125J-VIP; tracer aus Jodierung I).

Es deutet sich an, daß eine Verschiebung des pH vom alkalischen in den sauren Bereich die spezifische Bindung von 125J-VIP erhöht. Allerdings war die Ausdehnung des untersuchten pH-Bereichs zu gering, um ein pH-Optimum der spezifischen Bindung auffinden zu können.

Menschliches Serum-Albumin (HSA) scheint konzentrationsabhängig die spezifische Bindung von 125J-VIP an das Substrat zu vermindern. In Anlehnung an die Literatur (s.Tab.5) wurde aber auf Albumin nicht verzichtet. Wir entschieden uns für die Konzentration von 0,5%, bei der der unerwünschte Effekt (Bindungsabnahme) nicht sicher ins Gewicht fällt. Der pH wurde bei 7,4 gewählt, da den physiologischen Verhältnissen ähnelnde Reaktionsbedingungen wichtiger schienen als Bedingungen mit optimaler spezifischer Bindung.

Nicht abgebildet sind die Daten zur Bedeutung der Puffer-Konzentration: bei J.G. und D.F. ergaben sich keine Unterschiede in der spezifischen Bindung, ob nun 50mM oder 100mM Hepes verwendet wurden. Der Einfluß des in vielen Arbeiten (s. Tab.7) als Protease-Inhibitor verwendeten Bacitracin (46) schien einer genauen Abklärung zu bedürfen, da widersprüchliche Daten über seine Wirksamkeit publiziert sind (27, 39). Im Experiment (Abb.7 unten) wurden isolierte Zellen (Spender L.V., je $3{,}8 \times 10^6$) mit steigenden Bacitracin- Konzentrationen bis 160 U/ml inkubiert (Volumen 0,5ml, Puffer mit 100mM Hepes pH 7,4, 182516 ±6653cpm 125J-VIP/Jodierung I: ca. 1,536nM, in der Hälfte der Ansätze

60nM unmarkiertes VIP zur Messung unspezifischer Bindung, Temperatur 37°C, Inkubationsdauer 30 Minuten, Stop mit 0,8ml eiskaltem Puffer, Zentrifugation 2 Minuten).

Das Resultat zeigt, daß bei einer Inkubation von 30 Minuten mit Bacitracin zwar sowohl die absolut gebundene als auch die unspezifisch gebundene Radioaktivität sinkt, Bacitracin aber keinen Einfluß auf die spezifische Bindung hat. Als verzichtbarer unphysiologischer Reaktionsteilnehmer wurde Bacitracin in der Folge nicht mehr verwendet.

Der Einfluß der Temperatur geht aus dem in Abbildung 8 dargestellten Experiment (Spender F.P., je $3x10^6$ Zellen) mit Inkubationstemperaturen zwischen 9°C und 60°C hervor (Inkubatvolumen 0,5ml, Puffer mit 100mM Hepes pH 7,4, 37911 ± 1465cpm ca. 0,5nM 125J-VIP -Jodierung II-, 50nM unmarkiertes VIP in der Hälfte der Ansätze, Inkubationsdauer 30 Minuten, Stop mit 0,8ml kaltem Puffer, zweiminütige Zentrifugation, übrige Bedingungen wie im Experiment der Abb.7 unten). Deutlich ist ein Temperaturoptimum im Bereich von 42°C, während die spezifische Bindung sowohl bei 9°C als auch bei Erhitzung auf 60°C sehr gering ist. Auffällig ist ferner, daß die unspezifische, also durch unmarkiertes VIP verdrängbare, Bindung unabhängig von der Temperatur ist. Auch hier, wie bei der Festlegung des pH, wurde für die Hauptversuche durch Wahl der Reaktionstemperatur bei 37°C mehr Wert auf physiologische Verhältnisse als auf maximale spezifische Bindung gelegt.

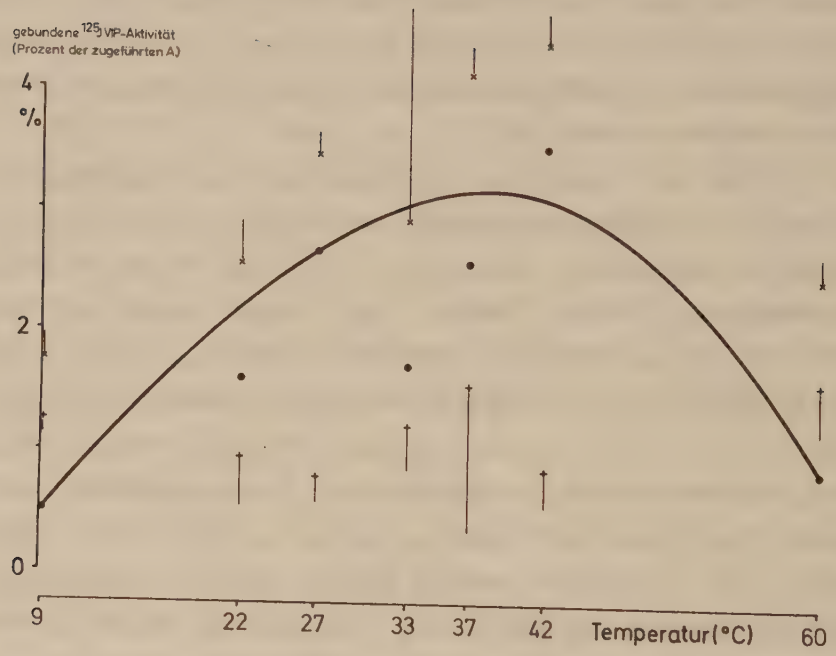

Abbildung 8

Temperaturverhalten der Bindung von 125J-VIP an isolierte menschliche T-Lymphozyten

(Symbole wie Abb. 7 unten)

Um die Bindungsstudien möglichst standardisiert durchführen zu können, waren auch die Bedingungen der Zentrifugation festgelegt worden. Zur Frage nach ihrer Dauer zeigte sich, daß zwischen Zentrifugationszeiten von 1, 2 und 5 Minuten Dauer keine Unterschiede der spezifischen Bindung bestanden, also nicht mehr Radioaktivität tragende Zellen gesammelt werden konnten. Andererseits besteht bei der Zentrifugation die Gefahr, daß Zellen unter dem Einfluß der Zentrifugalkraft bei 9000g platzen und die Versuchsergebnisse störende Inhaltsstoffe (z.B. Proteasen) freisetzen - dies wohl umso eher, je länger die Kräfte wirken. Aus diesen Überlegungen heraus wurde für die Zentrifugation die Dauer von einer Minute gewählt.

Die Frage, ob Spülungen des Zellsediments Vorteile brächten, indem etwa die unspezifische Bindung verringert werden könnte, mußte nach weiteren eigenen, hier im einzelnen nicht dargestellten Experimenten negativ beantwortet werden.

Schließlich wurde auch der Einfluß des Inkubationsvolumens und der zur Auswahl stehenden Reaktionsgefäße (maximaler Inhalt: 0,5 oder 1,5ml) untersucht; 0,2ml Inkubationsvolumen in 1,5ml-Gefäßen erwies sich besser als 0,5ml Inkubat. Am besten schnitten die kleineren Gefäße mit 0,2ml Inkubat ab. Dort war die gesamte gebundene Radioaktivität am höchsten (wohl ein Konzentrierungs-Effekt), die unspezifische Bindung am geringsten, kaum unterscheidbar von "no tissue blanks" (wohl weil die Aspiration des Überstandes in den schmalen Gefäßen vollständiger als in den 1,5ml-Gläsern erfolgen konnte).

Die für die folgenden Versuche ausgewählten Reaktionsbedingungen seien hier noch einmal zusammengefaßt:
Temperatur 37°C, Puffer von pH 7,4 mit 50 oder 100mM Hepes, 0,5% Serumalbumin (HSA) als Zusatz, kein Bacitracin, Dauer der Zentrifugation 1 Minute, Inkubationsvolumen 0,2ml.

2, Zeitverlauf der Bindungsreaktion

Durch Beendigung der Bindungsreaktion nach verschieden langer Dauer wurde ihr Zeitverlauf untersucht, das heißt, die gebundene Radioaktivität wurde als Funktion der Reaktionszeit erfaßt (Abb.9). Isolierte Zellen (Spender D.K.: $3x10^6$, S.T.: $2,8x10^6$) wurden für 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120 und 180 Minuten in 0,2ml Medium mit 0,5% HSA, 50mM Hepes pH 7,40 und ca. 50pM 125J-VIP (Jodierung III, D.K.: 62341 ± 1248cpm, S.T.: 61949 ± 1193cpm) in Dreifachansätzen mit/ohne 50nM VIP bei 37°C inkubiert. Stop mit 0,2ml eiskaltem Medium, einminütige Zentrifugation. Die Bindung von 125J-VIP an isolierte T-Lymphozyten geschah rasch und erreichte ein Maximum nach 30 Minuten Reaktionszeit. Im Zeitraum zwischen 30 und 45 Minuten waren keine Veränderungen festzustellen. Mit längeren Reaktionszeiten nahm die gebundene Radioaktivität wieder ab.
Für die unspezifisch gebundene Radioaktivität, also bei Überschuß von unmarkiertem VIP im Reaktionsgefäß, ließ sich keine Zeitabhängigkeit feststellen; sie ist konstant in der Zeit.

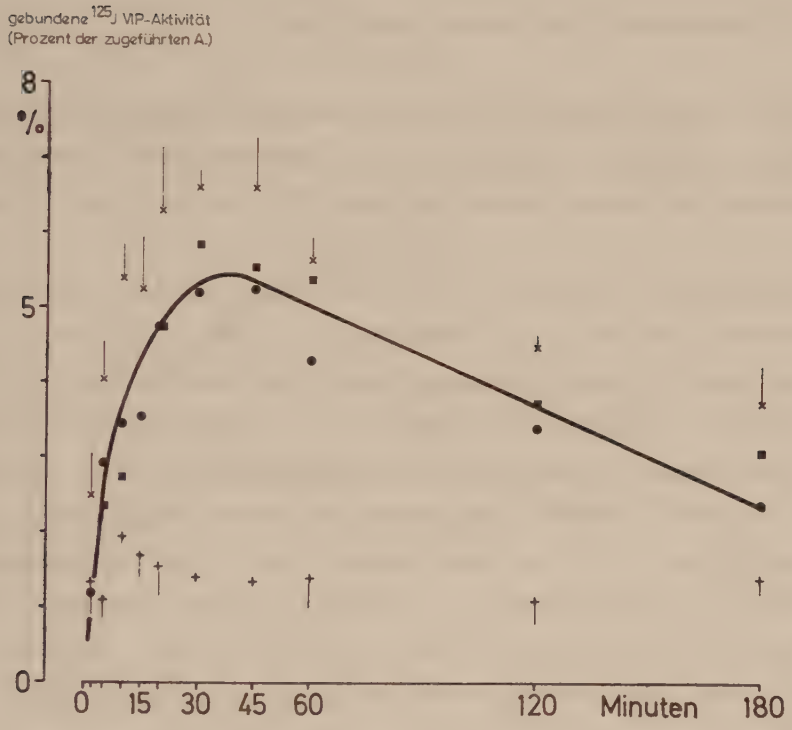

Abbildung 9

Zeitverlauf der Bindungsreaktion von 125J-VIP mit isolierten menschlichen T-Lymphozyten (Spender D.K.)

(x gesamte gebundene Radioaktivität,

+ gebundene Aktivität mit 50nM VIP im Inkubat, jeweils Mittel und Standardabweichung;

• spezifische Bindung;

bei Spender S.T. ist nur die spezifische Bindung - ■ - dargestellt, der Übersichtlichkeit halber sind die übrigen Werte, die denen bei D.K. entsprechen, nicht eingezeichnet)

3, Reversibilität und enzymatischer Abbau

Die im vorigen Absatz beschriebene Beobachtung einer zeitbedingten Abnahme spezifisch gebundener Radioaktivität nach einem Plateau muß wohl so erklärt werden, daß sich 125J von den Zellen löst.

Deswegen wurde versucht, den Prozeß der Abnahme spezifischer Bindung isoliert zu untersuchen. Dazu zeigt Abb.10 ein Experiment, in dem die Bindungspartner der Reaktion, 125J-VIP und isolierte T-Lymphozyten, nach einer Inkubation von 45 Minuten wieder reinem Inkubationsmedium ausgesetzt wurden. Die Komponente der Bindung zwischen den Reaktionspartnern kann hier, da alles ungebundene 125J-VIP entfernt wurde, nicht mehr in Erscheinung treten. $3x10^6$ Zellen (L.S.) wurden in Zweifachansätzen in 0,2ml Medium mit 125J-VIP (Jodierung V, 45511 ± 1135cpm: ca.50pM) bei An- bzw. Abwesenheit von 600nM unmarkiertem VIP inkubiert. Die Reaktion wurde nach 10, 15, 20, 30 und 45 Minuten mit 0,2ml eiskaltem Puffer gestoppt, 1 Minute Zentrifugation, Aspiration. 8 Reagenzgläser wurden nach 45 Minuten ebenso behandelt, anschließend aber wurde wieder Reaktionsmedium von 37°C zugefügt (Dauer des Vorgangs ca. 5 Minuten). Das endgültige Reaktionsende folgte hier nach weiteren 15 bzw. 30 Minuten Inkubation bei 37°C (0,2ml eiskalter Puffer, 1 Minute Zentrifugation, Aspiration).
Es zeigt sich deutlich eine zeitabhängige Abnahme der spezifischen Bindung, die Bindung ist also reversibel. Ein weiteres Experiment zeigte, daß diese Abhängigkeit eine lineare ist (aus 45).

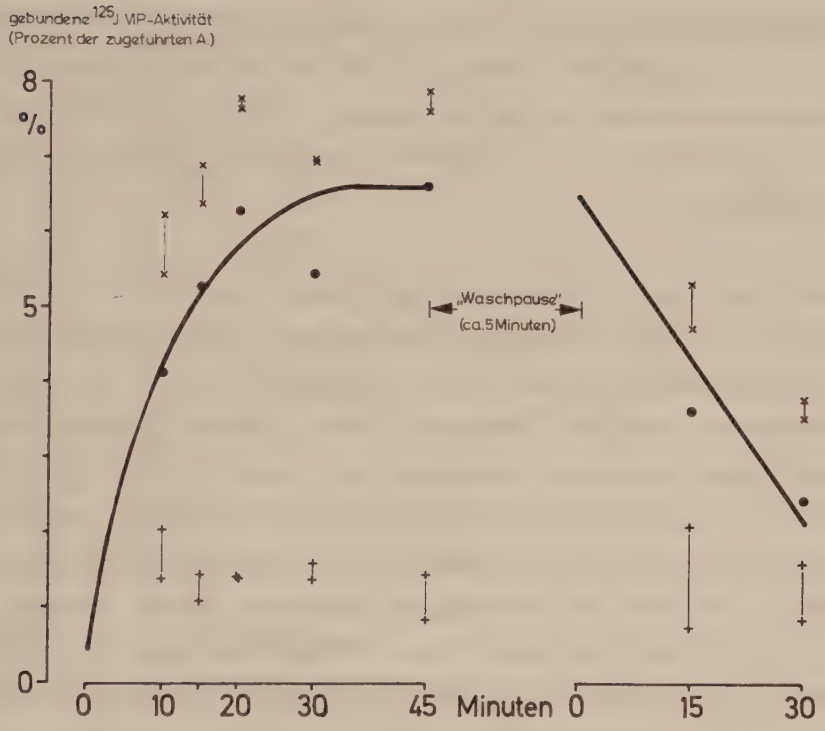

Abbildung 10

Reversibilität der Bindung von 125J-VIP an isolierte T-Lymphozyten

(x gesamte gebundene Aktivität,

+ gebundene Aktivität mit 600nM unmarkiertem VIP,

• spezifische Bindung - Differenz der Mittelwerte)

$2x10^6$ isolierte Zellen waren mit 30pM 125J-VIP 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert worden. Nach Zentrifugation und Aspiration des Überstandes wurden die Zellen binnen 90 Sekunden in frischem Medium resuspendiert. Nach 2, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten wurde die Reaktion endgültig beendet (kaltes Medium, Zentrifugation) und die Radioaktivität in den Gefäßböden gemessen. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis.

Noch nicht geklärt ist, ob nun die Abnahme spezifisch gebundener Radioaktivität von 125J so vonstatten geht, daß das ganze Molekül 125J-VIP wieder von den Zellen dissoziiert oder ob sich nur radioaktiv markierte Fragmente lösen. Diese Fragmente könnten durch einen Abbauprozeß entstehen, der möglicherweise schon von Anfang an gegenläufig zur Bindungsreaktion in Aktion ist und von Proteasen, die entweder Bestandteil des hypothetischen Rezeptors sind, oder aber aus beschädigten Zellen frei werden, ausgeht. Da sich durch einen solchen Prozeß fälschlicherweise zu niedrige Werte an gebundener Radioaktivität ergäben, wurde zum Ausschluß einer Fehlerquelle die Möglichkeit des enzymatischen Abbaus näher untersucht. Dabei wurden die Methoden der Dünnschichtchromatographie bzw. des Radioimmunassay verwendet.

Zum ersten wurde 125J-VIP über eine Zeit von 45 Minuten mit isolierten Zellen inkubiert und der Überstand der Reaktion dünnschichtchromatographisch analysiert. Das Ergebnis wurde mit der chromatographischen Analyse von 125J-VIP verglichen, das mit Ausnahme der Anwesenheit von Zellen identisch behandelt worden

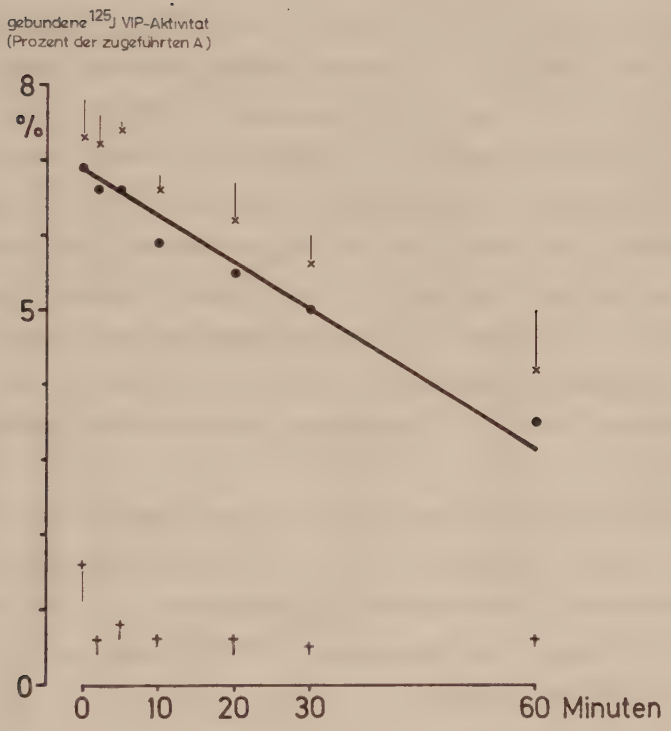

Abbildung 11

Dissoziation des gebundenen 125J-VIP von isolierten menschlichen T-Lymphozyten (umgezeichnet nach 45, Fig.2)

✖ gesamte gebundene Radioaktivität

✚ gebundene Aktivität mit 50nM unmarkiertem VIP, Mittelwerte und Standardabweichungen

● spezifische Bindung: Differenz der Mittelwerte

war. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 wiedergegeben. In Dreifachbestimmungen war ca. 0,5nM 125J-VIP (ca. 130000cpm, Jodierung IV) für 45 Minuten bei 37°C in Inkubationsmedium inkubiert worden. In einem zweiten Ansatz waren zusätzlich jeweils $3,3x10^6$ isolierte T-Lymphozyten (Spender J.A.) anwesend. Nach Inkubationsende und einminütiger Zentrifugation wurden die Überstände beider Dreiergruppen durch Aspiration mit einer Spritze gesammelt und über Nacht bei 6°C aufbewahrt. Zur Chromatographie wurden 20µl des Aspirats in 5µl-Portionen (zusammen ca. 5000cpm) auf den Startpunkt der Chromatographieplatte aufgetragen. Nach 225 Minuten Wanderungszeit wurde die Platte in Fraktionen aufgeteilt und die enthaltene Radioaktivität gemessen (Details S.39).
Wie Abb.12 zeigt, ließen sich mit dieser Methode keine auffälligen Unterschiede zwischen den chromatographischen Profilen feststellen. Insbesondere die Abwesenheit neuer Maxima ("peaks") spricht gegen die Entstehung von VIP-Fragmenten durch Aktivität der anwesenden Zellen.

Mit derselben Methode wurden weitere Überstände von 125J-VIP, inkubiert unter verschiedenen Temperaturbedingungen und mit Bacitracin, analysiert, wobei allerdings die in der Hälfte der Ansätze vorhandenen T-Lymphozyten anders, als in den Experimenten dieser Arbeit üblich, präpariert worden waren (zusätzlicher Adhärenzschritt vor Nylon-Filtration, heterologes Spenderserum im RPMI 1640). Die Ergebnisse sind in der Aussage identisch mit Abb.12 und deshalb hier nicht eigens dargestellt. Auch hier

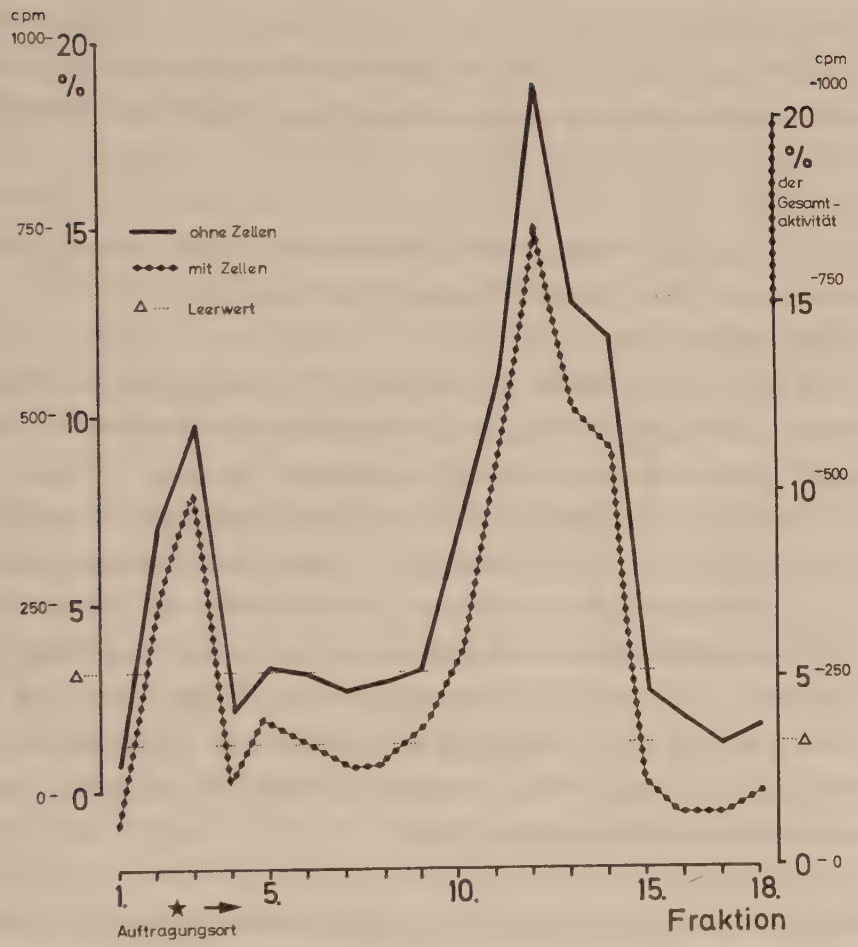

Abbildung 12

Dünnschichtchromatographie von 125J-VIP nach Inkubation ohne und mit isolierten menschlichen T-Lymphozyten

(gesammeltes Aspirat aus Dreifachbestimmungen)

zeigte sich kein Unterschied in den chromatographischen Profilen zwischen den mit oder ohne Zellen inkubierten Lösungen von 125J-VIP, gleichgültig, ob die Inkubation bei 37°C, bei 22°C, bei 6°C oder bei 37°C und zusätzlich Bacitracin (1000IU/ml) im Medium stattgefunden hatte.

In einem zweiten Versuch wurde unmarkiertes VIP in An- bzw. Abwesenheit von Zellen inkubiert und dann im überstand mit dem Radioimmunassay gemessen.
100pM VIP in 0,2ml Puffer wurden bei 37°C in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von $3x10^6$ isolierten T-Lymphozyten inkubiert. (100pM waren gewählt worden, um etwas oberhalb der in Abb.9, 10 und 11 verwendeten Konzentrationen von radioaktiv markiertem VIP noch den Meßbereich des VIP-Radioimmunassay - untere Nachweisgrenze 15pM - zu erreichen.) Nach 30 Minuten (Reaktionsende mit 0,2ml kaltem Puffer, einminütige Zentrifugation, Aspiration des Überstandes mit Spritzen) enthielt das Reagenzglas mit Zellen etwa 88% an immunreaktivem VIP im Vergleich zu dem Gefäß, in dem aufgrund des Fehlens von Zellen kein biologischer Abbau stattgefunden haben konnte, nach 180 Minuten noch 58%.

Wegen der relativ geringen Rate biologischen Abbaus bei einer Inkubationszeit von 30-45 Minuten wurden die Bindungsstudien weiterhin bei 37°C durchgeführt. Dadurch lassen sich physiologische Verhältnisse eher nachvollziehen als durch die Verwendung tieferer Temperaturen oder die Zugabe von Protease-Inhibitoren.

4, Einfluß der Zellkonzentration

In weiteren Experimenten wurde die im Sediment befindliche Radioaktivität als Funktion der zur Inkubation verwendeten Zahl an Zellen untersucht. Neben der Darstellung des allgemeinen Zusammenhangs zwischen diesen beiden Größen sollte mit diesem Ansatz geklärt werden, welches die kleinste Menge von Zellen ist, mit der sich, im Sinne sparsamer Versuchsplanung, für weitere Untersuchungen noch brauchbare Unterschiede zwischen maximaler und unspezifisch gebundener Radioaktivität darstellen lassen. Die spezifische Bindung sollte also möglichst groß sein, wobei zugleich pro Ansatz so wenig Zellen wie möglich verwendet werden sollten, um bei der recht geringen Ausbeute aus 500ml Blut möglichst viele Datenpunkte zu erhalten.
Abbildung 13 zeigt das Ergebnis eines dieser Experimente. In 0,2ml Volumen wurden Suspensionen mit unterschiedlichen Zellzahlen ($0{,}3 \times 10^6$ bis $8{,}4 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz; Spender T.C.) mit ca. 130pM 125J-VIP (99437 $\pm$ 5401cpm, Jodierung VI) mit/ohne 210nM VIP für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Reaktionsstop mit 0,2ml eiskaltem Medium, 1 Minute Zentrifugation, dann Aspiration und Messung der Radioaktivität. Wie in der Abbildung erkennbar, zeigte die Inkubation von 130pM 125J-VIP mit isolierten Lymphozyten eine dosisabhängige Steigerung der Bindung von 125J-VIP. Dies betraf sowohl die gesamte als auch die durch einen Überschuß an unmarkiertem VIP (210nM) verdrängbare Radioaktivität im Sediment der Reaktion. Durch Regressionsanalyse lassen sich die Wertepaare als lineare Abhängigkeit darstellen, wobei sich für

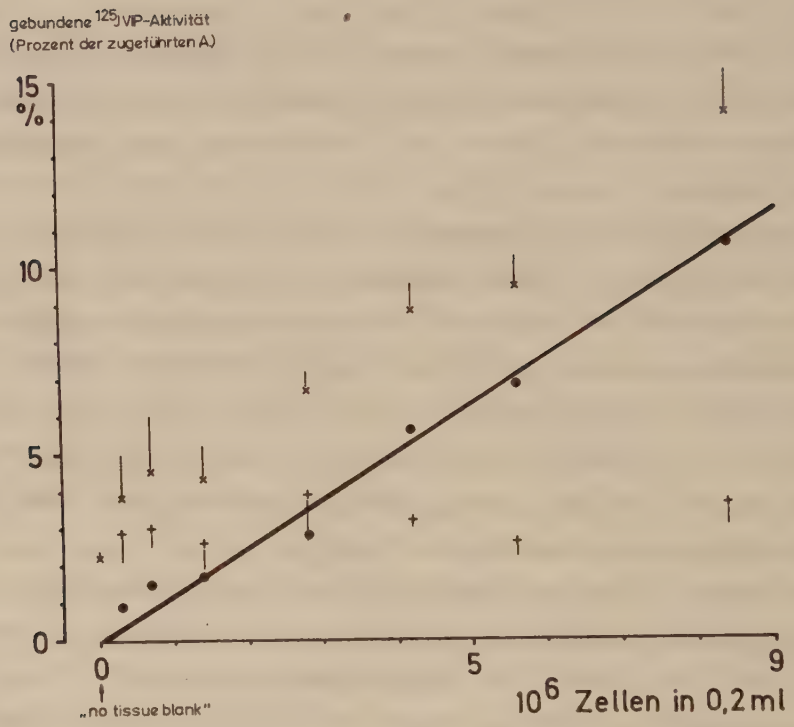

Abbildung 13

Bindung von 125J-VIP an isolierte T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Zahl der Zellen

(x gesamte gebundene Radioaktivität,

+ Bindung in Anwesenheit von 210nM VIP

- Mittelwerte und Standardabweichung von Dreifachbestimmungen -

• spezifische Bindung: Differenz der Mittelwerte)

die gesamte Bindung ein Korrelationskoeffizient von r=0,99 ergibt, während die unspezifische Bindung als Konstante zu betrachten ist. In einem zweiten, analogen Experiment (B.F.) fand sich ein entsprechendes Ergebnis mit r=0,82. (Diese Rechnungen basieren auf Ergebnismittelwerten.)
Aus der Definition der spezifischen Bindung als Differenz von gesamter und verdrängbar gebundener Radioaktivität folgt, daß spezifisch gebundenes 125J-VIP von der zur Inkubation verwendeten Zellzahl linear abhängig ist.

Erstes Kriterium für die Entscheidung, welches die geringste Zellkonzentration in späteren Experimenten sein sollte, waren die empirisch gewonnenen, nicht die durch die Regression errechneten Werte. Zweites Kriterium war die Empfindlichkeit des Zählgerätes (Leerwert 160cpm), oberhalb derer der Wert für unspezifische Bindung auf jeden Fall liegen sollte, um die Errechnung der Differenz zur totalen Bindung nicht zu verfälschen.
Aufgrund der gewonnenen Daten wurde als günstigster Bereich eine Konzentration um 3x10.6 Zellen pro Inkubationsgefäß angesehen. Diese Konzentration wurde in den Experimenten angestrebt, gelegentlich aber auch unterschritten, wenn trotz geringer Ausbeute an Zellen ein Verzicht auf vorgesehene Datenpunkte nicht in Frage kam. Ferner zeigt sich in Abb.13, daß die unspezifische Bindung recht konstant ist, also kaum von der Zahl der Zellen abhängt. Außerdem scheint sie, da sie nur wenig über der "no tissue blank" liegt, vor allem durch Bindung an Bestandteile des Reaktionsgefäßes bedingt zu sein.

5, Kompetitionsstudien (125J-VIP und unmarkiertes VIP)

In diesen Ansätzen wird die den Zellen zugesetzte Menge von 125J-VIP konstant gehalten, unabhängig gewählte Variable ist die Konzentration von unmarkiertem VIP im Inkubat. Als abhängige Variable wird wiederum die im Sediment befindliche Radioaktivität gemessen. Das zugrundeliegende Konzept der kompetitiven Bindungsanalyse gelangt auch im Radioimmunassay oder der Messung von Schilddrüsenhormon mit hormonbindenden Serumproteinen zur Anwendung (vgl. 125). Das Ergebnis sollte sowohl quantitative Analysen der Reaktion zwischen 125J-VIP und den isolierten Zellen erlauben, als auch eine Kontrolle darüber, ob die in den bisherigen Versuchen verwendete Konzentration an unmarkiertem VIP im angestrebten Bereich maximaler Verdrängung von 125J-VIP gelegen hat.

Abbildung 14 zeigt drei Studien, ausgewählt aus den zahlreichen Experimenten. Isolierte T-Lymphozyten von verschiedenen Blutspendern (R.K.: $3x10^6$, L.B.: $2x10^6$, A.D.: $2,8x10^6$ Zellen) wurden in Zwei- oder Dreifachansätzen mit 125J-VIP (Jodierung III; R.K.: 60744 $\pm$721cpm, L.B.: 55717 $\pm$616cpm, A.D.: 63223 $\pm$972cpm) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Mit 125J-VIP konkurrierten in den Inkubaten Konzentrationen von unmarkiertem VIP zwischen 0 bzw. $5x10^{-14}$ M und $5x10^{-7}$ M. Es ist zu erkennen, daß VIP-Dosen unterhalb der Konzentration von 125J-VIP keine Wirkung hatten, aber höhere Dosen über einen Konzentrationsbereich von drei Zehnerpotenzen einen dosisabhängigen Abfall der

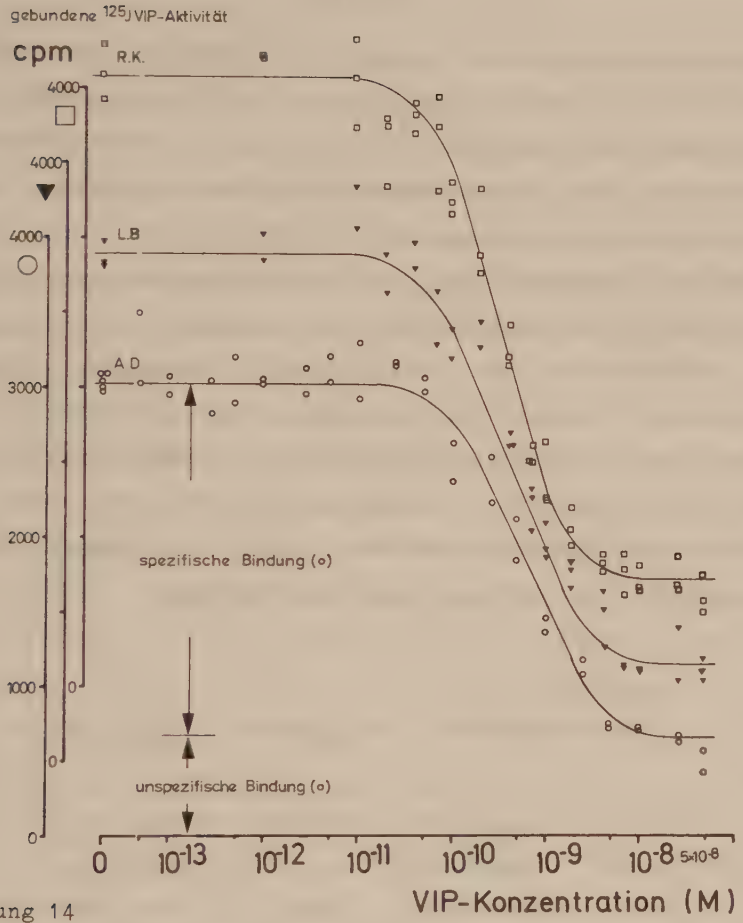

Abbildung 14

Kompetition zwischen 125J-VIP und verschiedenen Konzentrationen von unmarkiertem VIP (halblogarithmische Darstellung)
Isolierte T-Lymphozyten von 3 Spendern; angegeben sind die experimentell gewonnenen Meßwerte ohne Mittelung
(4000cpm an gebundenem 125J-VIP entsprechen etwa 0,58fmol; Hilfslinien zur Erläuterung der Grundbegriffe "spezifische" und "unspezifische Bindung")

gebundenen Radioaktivität bewirkten, der sich in der gewählten Darstellung als sigmoide Kurve zwischen zwei Plateaus äußert. Somit ist auch deutlich, daß ab einer Konzentration des unmarkierten VIP, die hundertmal größer ist als die von ^{125}J-VIP, keine weitere Kompetitionswirkung sichtbar wird. (Die bisher verwendeten Konzentrationen zur Bestimmung der unspezifischen Bindung waren also ausreichend.) Der Wendepunkt der Kurve bedeutet die Konzentration zur halbmaximalen Hemmung der gebundenen Radioaktivität (IC50). Sie betrug ca. 0,5nM. Nimmt man eine Analyse der Daten nach der Methode von ROSENTHAL SCATCHARD vor (S.89-94 und Abb.23), so ergeben sich für die beiden, für derartige Bindungsstudien charakteristischen Parameter K_D und B_{max} folgende Werte aus den jeweiligen Experimenten:

	Affinitätskonstante K_D	Bindungsorte/ Zelle	Korrelations-koeffizient r
R.K.	0,258 nM	658	-0,69 (-0,82)
L.B.	0,579 nM	1807	-0,81 (-0,96)
A.D.	0,497 nM	942	-0,94 (-0,96)
Mittel:	0,445 nM	1136	

K_D und B_{max} sind, wie unten (S.89) ausgeführt werden wird, Maßzahlen für die Affinität der Bindungspartner respektive die Zahl der Bindungsorte.

6, Sättigung der spezifischen Bindung

Die Frage, ob die spezifische Bindung eine Sättigungscharakteristik aufweist, ist in Rezeptorstudien unausweichlich.
Zur direkten Untersuchung am verwendeten Zellsystem wurden Versuche durchgeführt, in denen bei unveränderten übrigen Bedingungen von Ansatz zu Ansatz nur die Menge der gesamt zugeführten Radioaktivität variierte.
Ein repräsentatives Experiment ist in Abbildung 15 dargestellt. $3{,}3 \times 10^6$ Zellen (J.M.) in Dreifachbestimmungen wurden in 0,2ml Medium mit verschiedenen Konzentrationen von 125J-VIP (Jodierung V; 10000cpm ca. 41pM; in Schritten von 6570 ± 213cpm, 12780 ± 369cpm, 24635 ± 171cpm, 48915 ± 435cpm, 73740 ± 3734cpm, 100505 ± 2386cpm, 125387 ± 2076cpm, 146267 ± 4147cpm) in Ab- bzw. Anwesenheit von 610nM VIP (des Tausendfachen der Höchstkonzentration von 125J-VIP) 45 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Stop mit 0,2ml eiskaltem Puffer, 1 Minute Zentrifugation. Unter identischen Bedingungen wurden "no tissue blanks" inkubiert: 125J-VIP in Schritten von 123858 ± 3996cpm, 103623 ± 1035cpm, 79234 ± 2974cpm, 59889 ± 1508cpm, 43691 ± 5314cpm, 21050 ± 304cpm, 10650 ± 87cpm, 5419 ± 33cpm; unmarkiertes VIP fehlte in den Ansätzen.
In Abb.15 erreicht die spezifische Bindung offensichtlich ein Plateau, während die unspezifische Bindung linear von der zugeführten Radioaktivität abhängt (Korrelationskoeffizient der Mittelwerte: r=0,98); ebenso wie die Werte der "no tissue blanks" (r=0,95)(Diskussion S.91).

Eine Analyse nach ROSENTHAL/SCATCHARD (S.89-91) erlaubte die Schätzung von Affinitätskonstante K_D und Zahl der Bindungsorte B_{max} (linearer Graph mit r=-0,91).

Wiederholungen des Experimentes litten darunter, daß der Anteil der unspezifischen Bindung höher als in Abb.15 abgebildet war und die Variation der Ergebniswerte ausgeprägter (was sich am Korrelationskoeffizienten der Analyse ablesen läßt). Zum Beleg seien die Resultate der ROSENTHAL/SCATCHARD-Analyse dieses und zweier identischer Experimente (stets 125J-VIP aus Jodierung IV) abschließend angeführt:

	Affinitätskonstante K_D	Bindungsorte/ Zelle	Korrelations- koeffizient r
J.M.	0,12 nM	350	-0,91
J.A.	0,24 nM	350	-0,65
A.G.	0,69 nM	215	-0,57
Mittel:	0,35 nM	305	

Wie gezeigt werden wird (S.91-92), ist bereits mit den Experimenten des vorhergehenden Abschnittes indirekt die Frage nach der Sättigbarkeit der spezifischen Bindung positiv beantwortet. Daneben ergibt sich aus der dort getroffenen Abschätzung der Parameter K_D und B_{max} eine Ergänzung und Plausibilitätskontrolle der nicht ganz befriedigenden direkten Sättigungsexperimente.

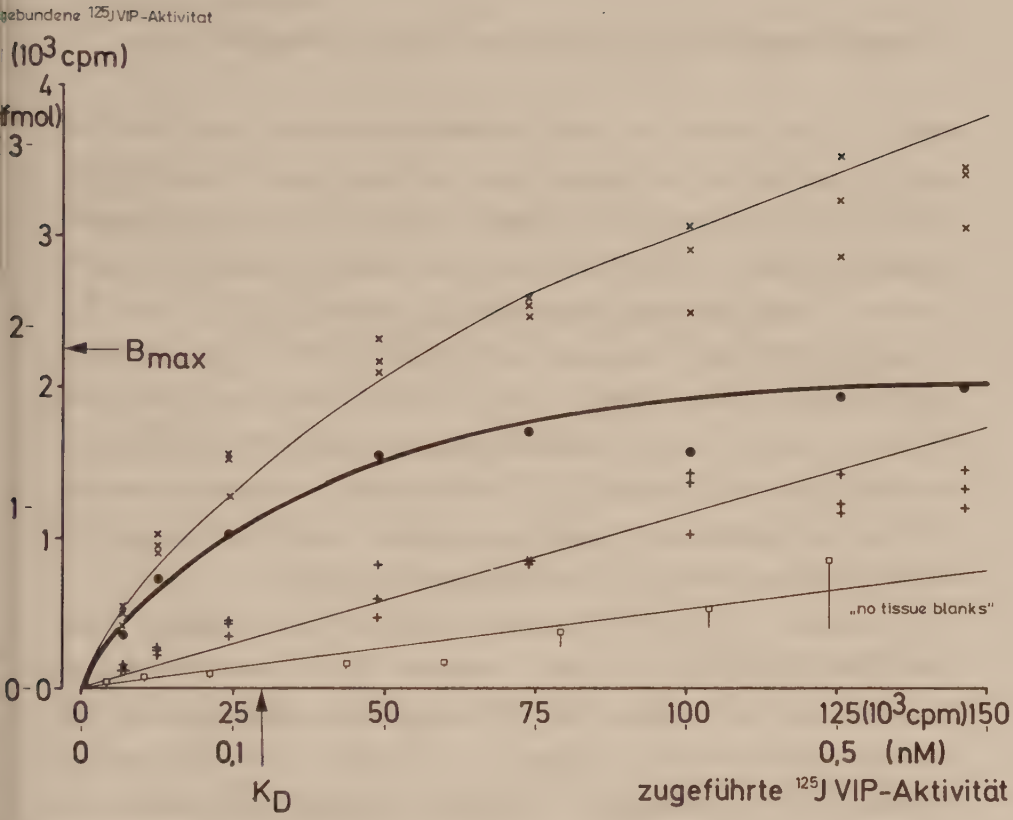

Abbildung 15

Sättigung der Bindung von 125J-VIP an isolierte T-Lymphozyten

(x gesamte gebundene Radioaktivität,

+ unspezifische Bindung, 610nM unmarkiertes VIP im Inkubat,

• spezifische Bindung, Differenz der Mittelwerte;

Hilfslinien nur als Anhalt)

Bindung in "no tissue blanks": ▫

(Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen;

Gerade einer linearen Korrelation mit r=0,95)

7, Kompetitionsstudien (125J-VIP und verwandte Peptide)

Genauso, wie zuvor VIP als Kompetitionspartner für 125J-VIP benützt worden war, so wurden jetzt im Vergleich mit unmarkiertem VIP die Peptide Sekretin, Glukagon und GIP in verschiedenen Konzentrationen in dieser Situation mit 125J-VIP getestet (Abb.16 und 17). Isolierte T-Lymphozyten (E.M.: $3x10^6$, T.C.: $2,5x10^6$) wurden bei 37°C für 45 Minuten mit 125J-VIP (E.M.: 49463 $\pm$ 1556cpm aus Jodierung V, ca. 52pM; T.C.: 41852 $\pm$ 679cpm aus Jodierung IV, ca. 175pM) in 0,2ml Inkubationsmedium inkubiert. Dabei waren zusätzlich die aus der Abbildung ersichtlichen Konzentrationen von VIP und den "verwandten" Peptiden anwesend. Stop der Reaktion mit 0,2ml eiskaltem Puffer, einminütige Zentrifugation.
In Abbildung 16 und 17 führen 50nM VIP zur Senkung der 125J-VIP-Bindung um 60-80%, während bei der zehnfachen Konzentration von Sekretin und der hundertfachen Konzentration von Glukagon und GIP die Bindung von 125J-VIP sich nicht von der Bindung im Vergleichsansatz ohne die Anwesenheit unmarkierter Peptide unterscheidet. (In den bereits publizierten Daten (45; Fig.5) sind die Konzentrationen auf der x-Achse wegen eines Rechenfehlers ungenau angegeben. Die hier in Abb.16 und 17 gezeigten Skalen geben die Verhältnisse im Experiment wieder.)

Außer VIP hat also keine der getesteten Substanzen in den verwendeten Konzentrationen einen Einfluß auf die Bindung von 125J-VIP an die isolierten Zellen.

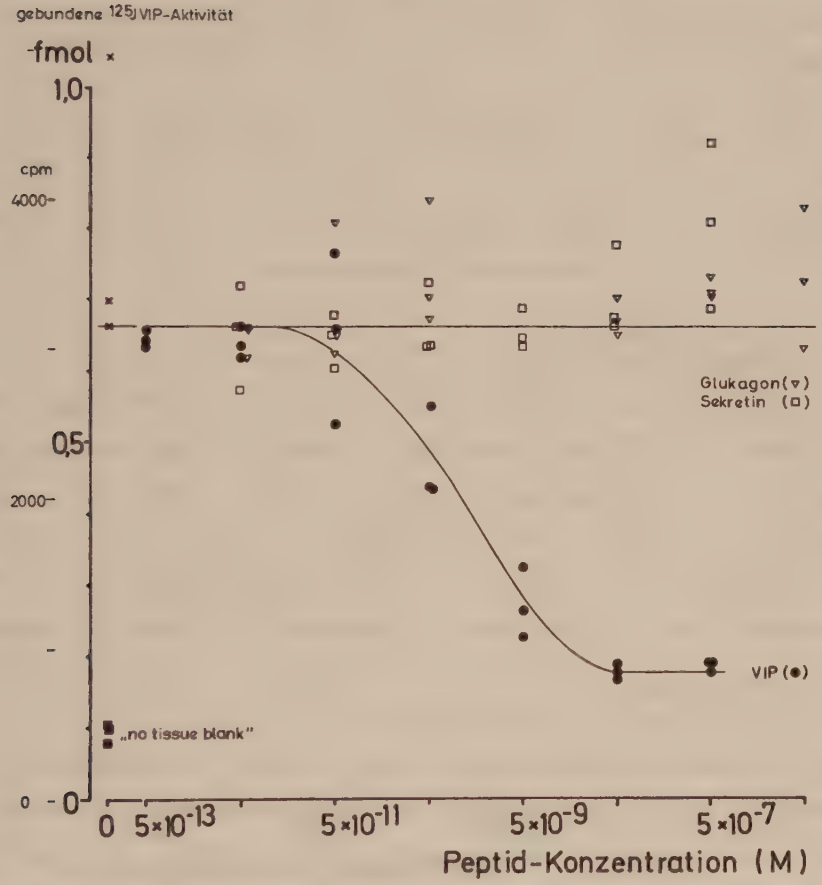

Abbildung 16

Peptide der "Sekretin-Glukagon-Familie" in Kompetition mit 125J-VIP um die Bindung an isolierte T-Lymphozyten (Spender E.M.) Verschiedene Konzentrationen von Sekretin (□), Glukagon (▽) und unmarkiertem VIP (●) standen in Kompetition mit 125J-VIP.
Zum Vergleich ein Inkubat mit 125J-VIP mit Zellen und ohne Zusätze (x:maximale Bindung) und eines mit 125J-VIP ohne Zellen und Zusätze (+:"no tissue blank").

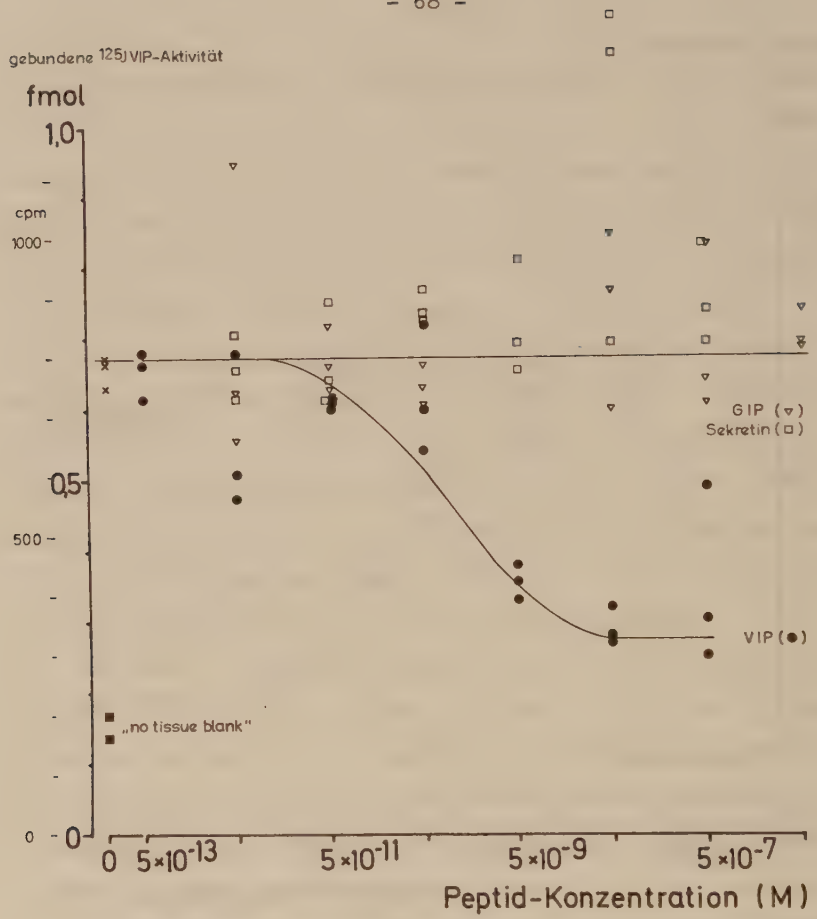

Abbildung 17

Peptide der "Sekretin-Glukagon-Familie" in Kompetition mit 125J-VIP um die Bindung an isolierte T-Lymphozyten (Spender T.C.) Sekretin (□), GIP (▽) und unmarkiertes VIP (●) als Kompetitoren

V, Diskussion

1, Sind die Kriterien der Rezeptortheorie hier erfüllt?

Es geht nun darum, die Kriterien für die Existenz von Rezeptoren (S.14-16) auf die Versuchsergebnisse anzuwenden.

Das Substrat der Bindung von 125J-VIP ist ein ZELLBESTANDTEIL: so muß der Befund der Linearität zwischen gebundener Radioaktivität und Zellzahl gedeutet werden. Die Bindung von 125J-VIP erfolgt an eine ENDLICHE ANZAHL von Bindungsorten. In den Kompetitionsstudien wurde nämlich deutlich, daß sich die Abnahme der im Sediment vorhandenen Radioaktivität durch höhere Konzentrationen an unmarkiertem VIP asymptotisch einem konstanten Wert annäherte. Bei dieser nicht verdrängbaren Radioaktivität kann es sich nur um unspezifische Bindung (z.B. an Zellbestandteile, aber auch Reagenzglasoberflächen oder "trapping")(S.84-86) handeln. Die Existenz eines verdrängbaren Anteils der Radioaktivität ("spezifische Bindung") wird dann plausibel, wenn markiertes und unmarkiertes VIP um eine endliche Anzahl von Bindungspartnern konkurrieren.
Die direkten Sättigungstudien deuten auf dasselbe Ergebnis: spezifische Bindung läßt sich nicht beliebig steigern, die Zahl der möglichen Bindungsorte muß endlich sein.

Die WECHSELWIRKUNG des Bindungs-Substrates mit VIP ist SELEKTIV. Die getesteten chemisch ähnlichen Peptide Glukagon, Sekretin und

GIP sind nämlich nicht in der Lage, effektiv mit 125J-VIP um die Bindung an T-Lymphozyten zu konkurrieren.

Zum Vergleich von Bindungsverhalten und BIOLOGISCHER ANTWORT (Kriterium C) müssen wir die bereits veröffentlichten Daten über die Aktivierung der T-Lymphozyten-Adenylzyklase (127) heranziehen. Die Daten sind natürlich nicht direkt vergleichbar: der Hauptunterschied beider Studien besteht im biologischen Substrat. Einmal handelt es sich um ein zellfreies System aus Membranen (127), hier dagegen wurden intakte Zellen verwendet. Entsprechend den unterschiedlich gestellten Fragen gibt es natürlich auch Unterschiede in den Inkubationsmedien.
Im Experiment der Abbildung 18 wurde Adenylzyklaseaktivität gemessen, nachdem Präparationen von Lymphozytenmembranen (45µg Protein) bei 37°C für 15 Minuten mit den angegebenen Mengen von VIP inkubiert worden waren. Aus Abb.18 wird jedenfalls deutlich, daß VIP die basale Aktivität von Adenylzyklase signifikant in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} M bis 10^{-6} M stimulieren kann. Das Maximum liegt bei 10^{-6} M, danach nimmt die Stimulationsfähigkeit wieder ab. Die Bindungsaffinität, die für die hier dargestellten Experimente errechnet wurde, befindet sich mit ca. 0,5nM in diesem Bereich. Leider fehlen Angaben zur halbmaximalen Stimulationsdosis (ED_{50}) der Adenylzyklase, so daß sich keine Überlegungen zum "stimulus response coupling" anstellen lassen. (Für menschliche VIP-Rezeptoren des Kolon-Epithels soll das "spare receptors"-Konzept zutreffen)(27).

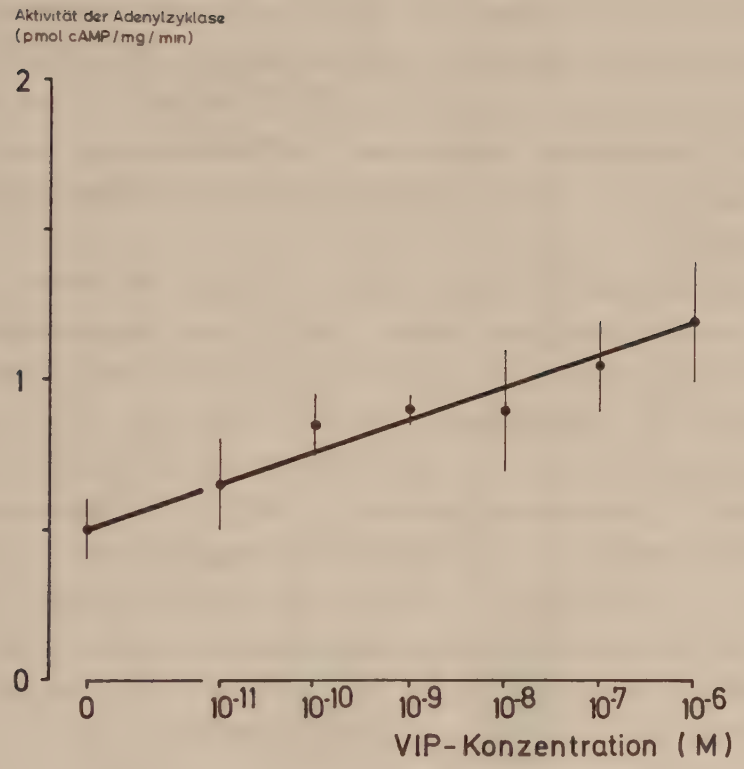

Abbildung 18

Aktivitätsabhängigkeit der Lymphozyten-Adenylzyklase von der VIP-Dosis (umgezeichnet nach Fig.1 in 127)

Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen aus einem von fünf gleichartigen Experimenten (Regressionsrechnung ergibt eine lineare Korrelation mit r=0,96)

Der Effekt von VIP auf die Adenylzyklase setzt schnell ein: bereits nach 5 Minuten ist eine signifikante Steigerung des basalen Wertes zu beobachten. Inkubationen über die Dauer von 15 Minuten hinaus scheinen keine zusätzliche Steigerung zu bewirken. Dieses Zeitverhalten ähnelt dem hier beobachteten, für die Bindungsreaktion liegt das Reaktionsplateau aber etwas später, bei 30 Minuten.

Auch an intakten T-Zellen, gewonnen wie hier beschrieben, läßt sich der stimulierende Effekt von VIP auf die Adenylzyklase nachweisen (Abbildung 19 nach 128). 10nM VIP bewirkten eine Erhöhung der cAMP-Synthese von 0,75 pmol bei 10^6 Zellen im Ruhezustand auf 1,15 pmol. Dieser Effekt wird durch Zugabe eines Hemmers (Isobutylmethylxanthin, 1mM) der cAMP-spaltenden Phosphodiesterase deutlich akzentuiert. Möglicherweise muß dies aber im Licht neuester Befunde (129) revidiert werden: diesen zufolge scheint die Adenylzyklase-Aktivitätssteigerung nur für transformierte Lymphozyten der Molt 4b-Kultur signifikant zu sein, eventuell aber nicht für periphere T-Lymphozyten.

Temperaturänderungen beeinflussen Bindungsreaktion und Adenylzyklaseaktivität im selben Sinn. Zur Verdeutlichung dieser Temperaturlabilität seien die entsprechenden Daten in Abbildung 20 gegenübergestellt. Die Daten zum Temperaturverhalten der spezifischen Bindung stammen aus dem Experiment der Abb.8.

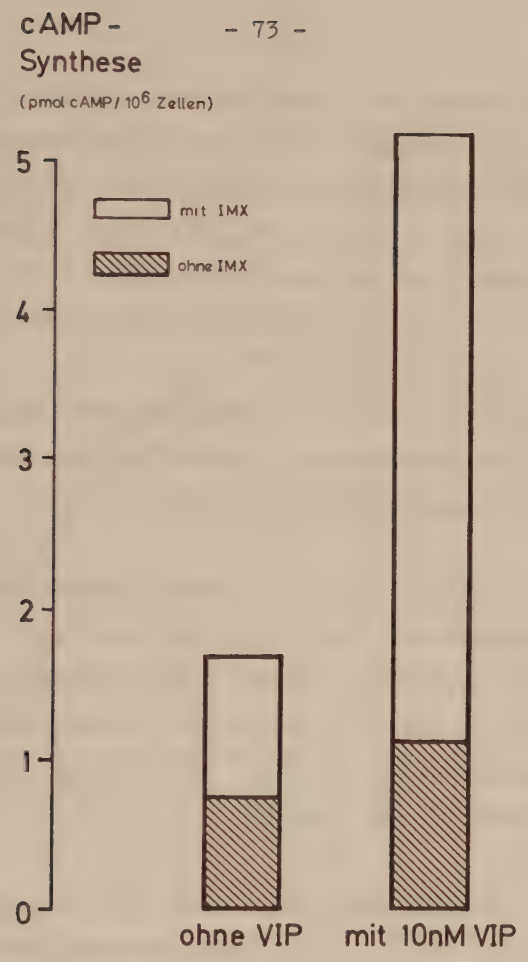

Abbildung 19

Wirkung von VIP auf cAMP-Synthese intakter T-Lymphozyten:

Isolierte menschliche T-Lymphozyten wurden in der Anwesenheit und Abwesenheit von 10nM VIP auf ihre Produktion von cAMP hin untersucht.

Derselbe Ansatz wurde in der Anwesenheit von 1mM Isobutylmethylxanthin (IMX) wiederholt.

Vergleichsdaten stammen aus einem Experiment (Fig.3 in 127), in dem die temperaturabhängige Aktivierung der Adenylzyklase in Lymphozytenmembran-Präparationen bei Gabe von 1µM VIP auf 80µg Membranprotein nach einer 15minütigem Inkubation gemessen wurde. Zur Verdeutlichung des Effekts waren auch noch 0,1mM des aktivierenden Nukleotids 5-Guanylyl-Imidophosphat zugesetzt worden.
Übereinstimmend zeigt sich das Temperaturoptimum beider Prozesse im Bereich der Körpertemperatur, ebenso die parallele Abnahme bei Temperaturabweichungen nach oben und unten.

Die Beobachtung des Zeitverlaufs der Bindungsreaktion (Abb.9) ist in Übereinstimmung mit den Tatsachen, die sich an bekannten Rezeptorsystemen beobachten lassen. Die BINDUNG von 125J-VIP erfolgte SCHNELL und sie zeigte ein AN-AUS-VERHALTEN. Die Reversibilität der Bindung scheint hier vor allem durch Diffusion des Liganden verwirklicht zu sein.

Das verwendete mathematische Modell hat für den Parameter der BINDUNGSAFFINITÄT einen HOHEN WERT ergeben. Wir haben die Berechnungen als Hinweis auf die Existenz nur einer einzigen Klasse von Rezeptoren interpretiert. Die geschätzte Zahl von ca. 1100 Rezeptoren pro Zelle liegt im Bereich des Spektrums sowohl anderer VIP-Rezeptoren als auch anderer Blutzellrezeptoren (Tab.5 und Tab.7).

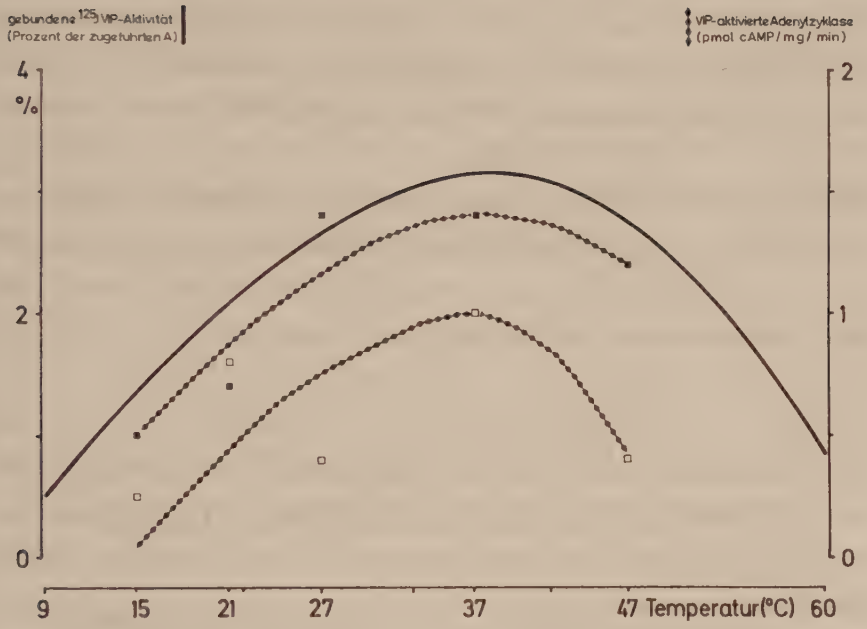

Abbildung 20

Vergleich der Temperaturabhängigkeit von spezifischer Bindung und Stimulierung der Adenylzyklase

Das Temperaturverhalten der spezifischen Bindung (●) wurde aus Abb.8 umgezeichnet. Zum Vergleich ist die überbasale Aktivierung (Differenz zwischen VIP-stimulierter und basaler Enzymaktivität: ■) von Lymphozytenmembran-Adenylzyklase durch VIP sowie dieselbe Größe bei zusätzlicher Anwesenheit von 5-Guanylyl-Imidophosphat (□) eingezeichnet (nach Fig.3 in 127).

Ob der 125J-VIP bindende Zellbestandteil nun MEMBRANSTÄNDIG oder intrazellulär lokalisiert ist, läßt sich aus den durchgeführten Experimenten nicht klären. Daß aber die VIP-sensitive Adenylzyklase-Aktivität in Zellmembranen aufzuzeigen ist, spricht dafür, auch den Bindungsort dort zu lokalisieren.

Zum Schluß dieses Abschnittes über die Identifikation von Rezeptoren sei die Frage gestellt, ob die mit Hilfe von 125J-VIP untersuchten Rezeptoren auch wirklich VIP-Rezeptoren sind, also physiologischerweise mit diesem Liganden reagieren.

Trotz der hohen Spezifität von VIP unter den für das Kompetitionsexperiment zur Verfügung stehenden Peptiden ist nicht auszuschließen, daß physiologischerweise eine VIP-ähnliche Substanz und nicht das hier verwendete VIP mit den Rezeptoren in Wechselwirkung tritt.
Für menschliches VIP, dessen Sequenz dem benutzten synthetischen VIP entspricht (49, 93), sind größere Molekülvarianten (48) und aus DNS-Analysen ein Vorläufermolekül "Prä-ProVIP" (93) bekannt, so daß es sich hier vielleicht um einen Bindungsort für ein "großes" VIP handelt.
Daneben kann die immer noch wachsende Zahl von Sekretin-Glukagon-Peptiden (vgl. die jüngste Entdeckung von PHI, Somatokrinin, PHM)(S.2, 4, Abb.1) als Argument für die Existenz eines noch unbekannten physiologischen Liganden benutzt werden.
So läßt das Vorkommen von Neuropeptiden im Thymus (167) sowie der Nachweis neurosekretorischer Granula in Thymus-Karzinoiden (55)

die Frage aufwerfen, ob ein Thymus-Peptid aus der "Glukagon-Sekretin-Familie" mit den beschriebenen Rezeptoren interagiert. VIP selbst ist im Thymus nicht nachweisbar (33, 131). Für einige Thymus-Peptide ist eine Wirkung auf Lymphozyten über cAMP bekannt und damit ein Berührungspunkt mit den hier beschriebenen Rezeptoren gegeben. Obendrein weist ein Peptid aus dem Thymus, Thymosin α_1 (isoliert vom Rind), bei Vergleich mit der Sequenz von VIP sechs homologe Aminosäuren auf:

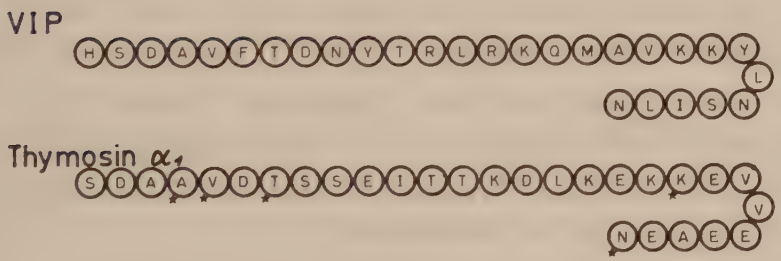

Abbildung 21: VIP und Thymosin α_1 (vgl. Abb.1, nach 76)

Auch Thymosin α_1 ist im Gehirn nachzuweisen (134). Es soll allerdings über Calcium-Einstrom und Aktivierung von zyklischem Guanosinmonophosphat wirken; eine Aktivierung der Adenylzyklase ist nicht gefunden worden (76).

Die Existenz eines physiologischen Liganden für die beschriebenen Rezeptoren anstelle von VIP, obwohl möglich, ist ohne ausführliche Kompetitionsstudien mit neuen "Sekretin-Glukagon-Peptiden" nicht gesichert.
VIP ist mit großer Wahrscheinlichkeit als DER LIGAND der Rezeptoren anzunehmen. Dies gründet sich vor allem auf die hohe Affinität der Bindungsorte und die große Empfindlichkeit des Adenylzyklasesystems.

2, Zur Gewinnung der Zellen und zur Jodierung von VIP

Wie bei allen Studien, die Gewebe durch eine Reihe von Reinigungsschritten gewinnen, so stellen sich auch bei der hier beschriebenen Isolation von Lymphozyten Fragen nach der Homogenität der Zellpopulation und deren Nachweis, ferner nach Einflüssen, die durch Wirkung während der Isolationsprozedur Veränderungen an den Zellen auslösen.

Es läßt sich einwenden, daß die beobachtete Bindung von 125J-VIP nicht durch Wechselwirkung mit den Lymphozyten, sondern mit den in geringer Zahl noch vorhandenen Monozyten oder Erythrozyten zustandekommt. Aus der Literatur ist dazu das Beispiel von Bindungsorten für Insulin bekannt, die zuerst auf Lymphozyten lokalisiert worden waren (6), aber tatsächlich mit Monozyten assoziiert zu sein scheinen (161).
Diesem Einwand gegen die hier verwandte Methodik steht gegenüber,

daß sich spezifische Bindung auch in den Experimenten zeigen ließ, wo bestimmte verunreinigende Zellpopulationen nicht nachweisbar waren (Granulozyten bei Spender J.G., J.A., T.C. und B.F., Monozyten bei J.M., Erythrozyten bei S.T. und A.D.)(vgl. Tab.2). Ferner wird in keiner Studie aus der Literatur (vgl. Tab.5 und 7) mit Zellpopulationen gearbeitet, die einen Reinheitsgrad von mehr als 90-95% aufweisen. Solange mit Trennmethoden gearbeitet wird, die vor allem auf physikalischen Eigenschaften von Zellen (z.B. Dichte) beruhen, ist dies wohl nicht anders zu erwarten (s.auch 98). Erst die Verwendung hochselektiver Verfahren auf der Grundlage biochemischer Eigenschaften dürfte diese Einschränkung aufheben. Ein solches Verfahren ist die Markierung von Zellen mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern. Die Zelltrennung könnte dann in einem "fluorescent cell sorter" erfolgen (88).

Bei den Methoden zur Identifikation der Zellpopulation ergeben sich Fehlerquellen aus der Verwendung morphologischer Kriterien. Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten werden sicher so gut wie nie mit Lymphozyten verwechselt, aber in manchen Fällen fiel die Entscheidung, ob Lymphozyt, ob Monozyt, nicht leicht. Systematische Kontrolle durch mehrere Beobachter war nicht möglich.

An der T-Zell-Identifizierung ist die Methode des Ausschlusses zu kritisieren. Da nur der Verunreinigungsgrad mit IgG-positiven Zellen bestimmt wurde, wäre es sachlich korrekter, von Nicht-IgG-positiven Zellen zu sprechen. Diese können aber als gute Annäherung an eine Präparation von T-Lymphozyten gelten (57),

was sich bei einer Überprüfung mit affirmativem Nachweis durch die monoklonalen Antikörper OKT3, OKT11 und Anti-Leu 10 bestätigte (45).
85% der Zellen reagierten mit OKT3, 95% mit OKT11, die (laut Hersteller Ortho, Raritan, New Jersey) 95prozentig spezifische Marker sind: OKT3 für periphere T-Lymphozyten, OKT11 für die klassische T-Lymphozyten-Eigenschaft der Rosettenbildung mit Schaferythrozyten (2). Je nach Definition der T-Lymphozyten ergibt sich ihr minimaler Anteil mit 80 bis 90 Prozent. Aufgrund der Untersuchung auf den spezifischen Marker Leu 10 findet sich eine Verunreinigung der Zellpräparation mit 3% B-Lymphozyten oder Monozyten (Anti-Leu 10 von Becton Dickinson, Mountain View, California).

Eigenwirkungen der Isolationsprozedur auf die Zellen lassen sich nicht ausschließen. Mit der Zellsuspension könnte endogenes VIP aus neutrophilen Zellen (126) in das Inkubationsgemisch gelangen, das mögliche Rezeptoren durch bereits erfolgte Bindung maskieren würde. Wegen der großen Zahl der Reinigungsschritte und ihrer Dauer, während derer sich ein möglicher Bindungsprozeß bereits umgekehrt haben müßte (vgl. Abb.9), ist dies unwahrscheinlich. Ferner war durch die Verwendung von Ca-freiem Medium in den ersten Schritten des Trennverfahrens, wo noch viele Neutrophile vorhanden sind, Vorsorge gegen eine Degranulation von Zellen getroffen worden (120).
Abschließend läßt sich sagen, daß die Kontrolle der Lebensfähigkeit der Zellen durch den Versuch der Färbung mit

Trypan-Blau (Ergebnis: mindestens 75% der Zellen nahmen den Farbstoff nicht auf; vgl.Tab.2) gröbste Schäden an den Zellen ausschließt. Diese nahmen auch in der Bindungsreaktion nicht zu, wie bei J.M. gezeigt wurde, wo die Zellen nach 60 Minuten Inkubation unter den Bedingungen der Bindungsstudien zu 95% nicht mit Trypan-Blau anfärbbar waren.

Fehlerquellen bei der radioaktiven Markierung von VIP bestehen in erster Linie in einer Veränderung des Moleküls durch die Reaktion (z.B. in Position 17 Entstehung von Methionin-Sulfoxid)(20). Auch sind Einflüsse aufgrund mangelnder Reinheit des synthetischen VIP oder anderer Reagentien möglich. Im Gegensatz zu anderen Autoren fand auch eine zusätzliche Reinigung nach der Jodierung nicht statt, obwohl die Dünnschichtchromatographie von 125J-VIP sich im Sinne einer Inhomogenität der radioaktiv markierten Substanz deuten läßt (zwei Aktivitätsgipfel aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit)(vgl. 38).

Für die spezifische Aktivität sind in den Bindungsstudien mit 125J-VIP (Tab. 5) kaum Versuche einer genauen Bestimmung zu finden (16, 39, 46). Fast immer wird auf einige wenige Quellenarbeiten verwiesen (39, 104). Dort wird von folgenden Überlegungen ausgegangen (24): Die zur Jodierung verwendete Menge an Radioaktivität (in Form von Na125J) liegt nach der Reaktion in 2 Fraktionen vor: an Peptid gebundenes 125J und freies 125J. Diese beiden Fraktionen sollen sich chromatographisch exakt trennen lassen. Die Menge der in der Peptid-Fraktion vorhandenen

Radioaktivität wird gemessen oder durch Subtraktion der Radioaktivität in der Jod-Fraktion von der Gesamtradioaktivität errechnet. Dieses Quantum an Aktivität soll an die verwendete, bekannte Menge Peptid gebunden sein. Der Quotient von Radioaktivität und Masse ergibt die spezifische Aktivität (8, 46, 104).

Dies sei am Beispiel der Jodierung IV gezeigt (s. Abb.4). Bei Addition der Radioaktivität in den Fraktionen des peptidgebundenen 125J (Fraktionen 6 mit 35) und einer Zählrate von 65% ergibt sich die Summe von 0,4651µCi 125J, das an die verwendeten 1,628µg VIP gebunden ist. Die spezifische Aktivität ist 28,6 Ci/g. Dieser Bestimmungsmethode liegt die Annahme zugrunde, daß in der Peptidfraktion das Peptid unverändert, nicht verunreinigt und vollständig zurückgewonnen werden kann.

Leichte Variationen im Verlauf der Jodierungsprozedur (Zeitdauer, Inhomogenität im Reaktionsgefäß, Temperatureinflüsse) werden bei diesen summarischen Angaben nicht berücksichtigt und damit die Notwendigkeit, für jede Zubereitung von 125J-VIP die spezifische Aktivität eigens zu bestimmen, übergangen.

Hier wurde die Methode des "self-displacement" vorgezogen (95), die in Arbeiten über VIP-Radioimmunassay Anwendung gefunden hat (38, 61). Wegen der Notwendigkeit der Interpolation von Kurven (vgl. Abb.5) ergibt sich zwar keine mathematische Exaktheit der Bestimmung, aber doch eine bessere Schätzung.

Zum Vergleich der beiden Bestimmungsmethoden seien die für mehrere Markierungsprozeduren erhaltenen Werte gegenübergestellt.

Jodierung (bzw. Autor)	spezifische Aktivität (Ci/g) Proportionalitäts-methode	Selbsthemmungs-methode
I	45,4	n.b.
II	26,3	n.b.
III	47,0	1165
IV	28,6	202
V	27,6	808
VI	34,4	643
Mittel:	34,9	704,5
Werte aus der Literatur:		
(104)	250	n.b.
(61)	n.b.	300
(38)	n.b.	600; 150

Die theoretisch maximal erreichbare spezifische Aktivität kann man aus der spezifischen Aktivität von reinem 125J errechnen (92, 98). Danach hätte ein Mol VIP mit dem Molekulargewicht von 3326 dalton (laut Hersteller Peninsula), bei dem auf jedes Molekül jeweils ein Atom 125J trifft, die Aktivität von $2{,}25 \times 10^{6}$ Ci, entsprechend einer spezifischen Aktivität von 676 Ci/g. Bei der erreichbaren Isotopenreinheit liegen 10% der Jodatome nicht als 125J vor: spezifische Aktivität ist dann 608 Ci pro Gramm VIP. Mit dem hier gewonnenen Mittelwert der spezifischen Aktivität von 705 Ci/g sind also alle VIP-Moleküle mit einem 125J markiert und 16% tragen zusätzlich ein zweites Jod-Atom.

Ob 125J-VIP auch biologisch aktiv ist, etwa in der Lage, die Adenylzyklase der Membranpräparation zu stimulieren, wurde nicht eigens untersucht. In der Literatur wird diese Frage positiv beantwortet (46, 53, 108).

3, Methodendiskussion der Bindungsreaktion

Bei der Kontrolle der Bedingungen der Bindungsreaktion wurde der Tatsache, daß die Pufferwirkung des verwendeten Hepes temperaturabhängig ist (163), dadurch Rechnung getragen, daß das Inkubationsmedium bei der Inkubationstemperatur (37°C) auf pH 7,4 eingestellt worden war.

Ob in den Kompetitionsstudien die unmarkierten Substanzen vorhanden waren, wurde durch die radioimmunologische Messung von VIP und GIP (35) kontrolliert. Für Sekretin und Glukagon war dies nicht möglich.

Die Methode der Zentrifugation in der Kleinzentrifuge kann, wie aus der Literatur bekannt, Anlaß zu Fehlern geben. Möglicherweise erfolgte die Beendigung der Reaktion mit eiskaltem Medium nicht schnell genug, so daß in der Zeit von bis zu 3 Minuten, während der die Zellen VIP-freiem Medium ausgesetzt waren, eine Dissoziation gebildeter Rezeptor-Ligand-Komplexe stattfinden konnte (14). Auch besteht die Möglichkeit, daß 125J-VIP rein physikalisch, räumlich, zwischen den Zellen eingefangen wird ("trapping"), das heißt, daß die Anwesenheit von Radioaktivität im Sediment nur auf geometrischen Gegebenheiten beruhen könnte (58). Leider war die zur Kontrolle beider Einflüsse sich anbietende Methode der Filtration nicht praktikabel. Die Temperaturabhängigkeit der spezifischen Bindung ist ein, freilich nicht eindeutiges Argument gegen das "trapping".

Ob VIP denn nun an Membranen oder in den Zellen gebunden wird, ist weder mit Filtration noch Zentrifugation beantwortbar. Auch der

mikroskopische Nachweis von an Zellen gebundener Radioaktivität würde wegen der Zweidimensionalität des Bildes die Unterscheidung nicht erlauben. Bindung an intrazelluläre Strukturen oder durch "trapping" ist aber angesichts der Existenz einer membranständigen, VIP-aktivierbaren Adenylzyklase (127) wenig wahrscheinlich.

Für die Frage, ob möglicherweise andere Bestandteile der Zellsuspension 125J-VIP binden können, kommt vor allem Albumin in Betracht. Spezifische Bindung aber ist unabhängig von Albumin-Zusatz und die Tatsache der Gewebelinearität (Abb.13) zeigt, daß die anwesenden T-Lymphozyten der entscheidende Faktor für die spezifische 125J-VIP-Bindung sind.

Sind die Faktoren, die die unspezifische Bindung bedingen, genauer zu charakterisieren? Unspezifische Bindung ist temperaturstabil (Abb.8), also wohl nicht durch organische Substanz bedingt. Somit kommen die bekannten Möglichkeiten des "trapping" und der Adsorption an Reagenzglas-Oberflächen in Betracht. Der letztere Faktor wurde näher untersucht (Abb.15). Bei "no tissue blanks" einer Sättigungsstudie, das heißt Inkubationsansätzen, in denen die Zellen als Bindungspartner fehlen, ergab sich, bei sonst identischen Reaktionsbedingungen mit VIP aus derselben Jodierung V, ein Anteil von ca. 0,6% der anfänglich zugesetzten Radioaktivität am Boden des Reagenzglases während die unspezifische Bindung in den Sättigungsstudien sonst ca. 1,1% betrug. Das heißt, etwa die Hälfte ist durch Adsorption an die Reaktionsgefäße, der Rest durch "trapping" oder unspezifische Bindung an Zellbestandteile, die nicht mit den untersuchten

Bindungsorten identisch sind, bedingt.

Was könnten die limitierenden Faktoren sein, die einen höheren Anteil als die erreichten 4-7% spezifischer Bindung verhindern? Erstens ist es die endliche Zahl der Bindungsorte. Zweitens sind die Meßwerte nur Momentaufnahmen eines Geschehens, in dem von Anfang an mindestens zwei Prozesse gegeneinander wirken, Bindung und Lösung von Bindungen, so daß sich spezifische Bindung nie in ihrem ganzen Betrag messen läßt.

Die in fast allen VIP-Bindungsstudien (Tab.5) beobachtete Degradation von VIP ließ sich hier im Radioimmunassay zeigen, mit der Chromatographie dagegen nicht. Zu einer exakten Korrektur um die Werte des enzymatischen Abbaus sind diese beiden Methoden offensichtlich nicht empfindlich genug, so daß darauf verzichtet wurde. Aufgrund technischer Beschränkungen war es nicht möglich, die für solche Korrekturen manchmal durchgeführte Präzipitation von unbeschädigten 125J-VIP-Molekülen mit Trichloressigsäure durchzuführen oder die Prüfung, in welchem Ausmaß bereits inkubiertes VIP wieder mit frischen Zellen bindungsfähig ist.

Ist der Wert von 4-7% spezifisch gebundener Anfangsradioaktivität tolerabel? In der Übersicht von VIP-Bindungsstudien (Tab.5) zeigt die Spalte mit den entsprechenden Werten, daß unsere Präparation sehr gut im Bereich der bisher veröffentlichten Werte liegt.

4, Aspekte der quantitativen Deutung

Der qualitative Nachweis von Phänomenen, die aus der Existenzannahme von Rezeptoren folgen, reicht aus, um die Existenz zu belegen. Aus den quantitativen Analysen ergeben sich zusätzliche Gesichtspunkte wie die Abschätzung der Zahl der Bindungsorte und die Festlegung einer Affinitätskonstante, die im Bereich der biologische Wirkungen auslösenden Ligandenkonzentration liegen sollte.

Beide Aussagen zusammen, sowie mögliche mathematische Hinweise auf die Existenz mehrerer Rezeptorklassen, ermöglichen den Vergleich der Rezeptorpopulationen verschiedener Gewebsherkunft untereinander (beispielhafte Frage: "Ist der VIP-Rezeptor im ZNS-Gewebe identisch mit dem von Pankreas-Acini?", abgeschwächt: "Haben die beiden Populationen identische quantitative Charakteristika?")(vgl. Tab.5). Insgesamt erleichtert die quantitative Analyse die Hypothesenbildung über die physiologische Bedeutung der Rezeptoren.

Die Annahmen, die uns zur Anwendung des mathematischen Modells berechtigen, sind komplex und, wenn überhaupt, nur für die wenigsten Systeme mit einfachen experimentellen Methoden auf ihre faktische Erfüllung hin zu überprüfen (vgl. 39).

Folgende Annahmen werden genannt (98):

1, Der Ligand liegt in homogener Form vor.

2, Radioaktiv markierter Ligand verhält sich identisch wie unmarkierter Ligand.

3, Es gibt keine Wechselwirkung der Bindungsstellen untereinander.

4, Ligand und Rezeptor sind univalent: das heißt, ein Molekül des Liganden reagiert nur mit einem Bindungsort.

5, Die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung verhält sich wie eine einfache reversible bimolekulare Reaktion.

6, Es herrscht vollständiges Reaktionsgleichgewicht.

7, Gebundener und freier Ligand lassen sich vollständig trennen, ohne daß dabei das Reaktionsgleichgewicht gestört wird.

Unklärbar in unserem System (wie in den meisten Systemen) auf der gewählten Stufe der rein funktionellen Analyse war die Erfüllung von Kriterium 2, 4, und 5, ungeklärt die Erfüllung von 1 und 3. Dafür, daß das Reaktionsgleichgewicht vorlag (Kriterium 6), sprechen die Studien zur Reaktionskinetik (Zeitverlauf: Plateau bei 30 Minuten).

Letztlich unklärbar bleibt Kriterium 7. Es wurde aber versucht, durch möglichst rasche Beendigung der Bindungsreaktion (Abkühlung, kurze Zeit zwischen Zentrifugation und Aspiration des Überstandes) weitestgehende Voraussetzungen für seine Erfüllung zu schaffen.

Von den erwähnten Annahmen ausgehend, läßt sich eine Folge von Gleichungen konstruieren (32, 98).
Für die Reaktion zwischen Rezeptor (R) und Ligand (L*) im Gleichgewicht gilt:

A $$(R) + (L^*) \underset{k-}{\overset{k+}{\rightleftharpoons}} (RL^*)$$

mit k+ und k- als Reaktionskonstanten für Hin- bzw. Rückreaktion.
Die Dissoziationskonstante K_D der Reaktion ist definiert als:

B $$K_D = \frac{k+}{k-} \qquad \text{oder:} \qquad K_D = \frac{(R) \times (L^*)}{(RL^*)}$$

Die Gesamtzahl an Rezeptormolekülen (B_{max}: maximale Zahl an Bindungsstellen) ergibt sich als Summe von (R) und (RL*) im Reaktionsgleichgewicht:

C $$B_{max} = (R) + (RL^*)$$

Aus B und C folgt:

D $$(RL^*) = \frac{B_{max} \times (L^*)}{K_D + (L^*)}$$

Diese hyperbolische Funktion D ist mathematisch identisch mit der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung der Enzymkinetik und ist in Abb.22 dargestellt.

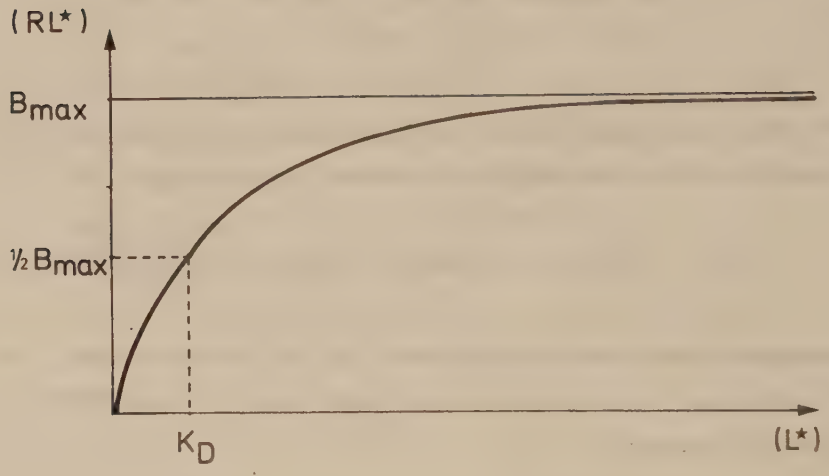

Abbildung 22: Theoretische Sättigungskurve

Ihr zugrunde liegt ein Sättigungsexperiment mit (RL*) als Funktion von (L*) (vgl. Abb.15).

In der Enzymkinetik ergibt bekanntlich die Analyse nach LINEWEAVER-BURKE eine mathematisch und graphisch leichter zu behandelnde lineare Abhängigkeit (101). Das Analogon dafür bei Rezeptorbindungsstudien ist die Analyse nach ROSENTHAL-SCATCHARD (32, 149, 156).

Die Formel dafür lautet:

$$E \qquad \frac{(RL^*)}{(L^*) - (RL^*)} = -\frac{1}{K_D} \times (RL^*) + \frac{B_{max}}{K_D}$$

Bei der graphischen Auftragung dieser Beziehung wird der Quotient von spezifisch gebundenem zu freiem Liganden, $(RL^*)/(L^*)-(RL^*)$, gegen (RL^*), den spezifisch gebundenen Liganden, aufgetragen. B_{max} ergibt sich dann als Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse, während ihre Steigung $-1/K_D$ die Errechnung von K_D erlaubt.

Meßbar im Sättigungsexperiment (Abb. 15) ist (RL^*) als spezifisch gebundene Radioaktivität, während (L^*) die Konzentration des zugesetzten Liganden ist und (L^*-RL^*) sein freier, ungebundener Anteil. Aus dem Experiment läßt sich mit dieser Methode die Bindungsaffinität mit K_D =0,12nM und die Zahl der Bindungsorte mit ca. 350 pro Zelle schätzen.

Aber auch Kompetitionsstudien von radioaktiv markiertem und unmarkiertem Liganden lassen sich als Sättigungsstudien (mit Liganden jeweils abnehmender spezifischer Aktivität) auffassen (32).
Für diese experimentelle Anordnung gilt zu beachten, daß der Ligand in markierter (L^*) und unmarkierter Form (L') vorliegt.
Gleichung D wird zu:

$$F \qquad (RL') + (RL^*) = \frac{B_{max} \times [(L')+(L^*)]}{K_D + (L') + (L^*)}$$

Als Gleichung für (RL*) läßt sich dies (nach 3) angeben als:

$$G \qquad (RL^*) = \frac{B_{max} \times (L^*)}{K_D + (L') + (L^*)}$$

Zur einfachen graphischen Auswertung wird Gleichung E folgendermaßen erweitert:

$$H \qquad \frac{(RL^*) + (RL')}{[(L^*)+(L')] - [(RL^*)+(RL')]} = -\frac{1}{K_D}\left[(RL^*)+(RL')+\frac{B_{max}}{K_D}\right]$$

Da aber markierter und unmarkierter Ligand sich in ihrem Bindungsverhalten nicht unterscheiden sollen, das heißt:

$$J \qquad \frac{(L^*)}{(RL^*)} = \frac{(L')}{(RL')}$$

folgt:

$$K \qquad \frac{(RL^*)}{(L^*) - (RL^*)} = -\frac{1}{K_D}\frac{(RL^*)}{(L^*)} + [(L^*)+(L')] + \frac{B_{max}}{K_D}$$

In der Auswertung von Kompetitionsstudien (Abb. 14) ergibt sich dann der Quotient auf der linken Seite der Gleichung aus dem Verhältnis von spezifisch gebundener zu freier Radioaktivität von 125J-VIP (oft auch als "B/F" bezeichnet). Dieser Wert wird auf der y-Achse aufgetragen. Der x-Achse ist der Wert für die gesamte Bindung ("B") von VIP, unmarkiertes und 125J-VIP zusammen, zugeordnet. Die Steigung ($-1/K_D$) der Kurve ergibt K_D ihr x-Achsen-Abschnitt den Wert für B_{max} (Abb.23).

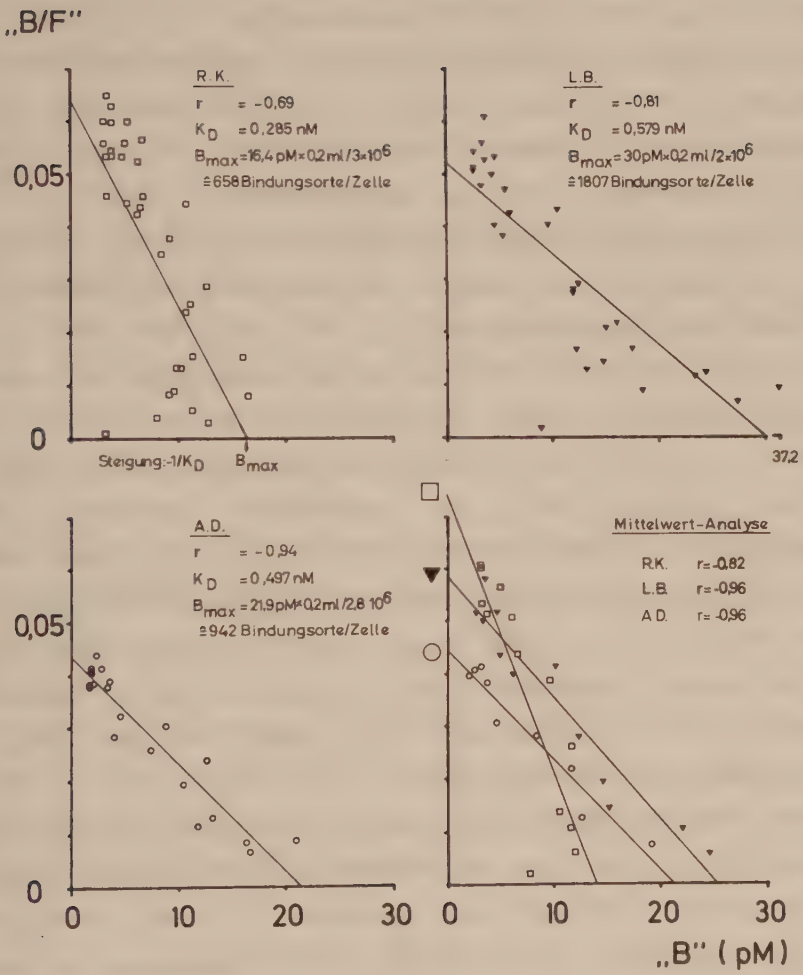

Abbildung 23

SCATCHARD-ROSENTHAL-Analyse der Kompetitionsstudien zwischen 125J-VIP und unmarkiertem VIP (vgl. Abb.14, Text S.92, 94)

Die Ergebnisse einer solchen Analyse sind der Abbildung zu entnehmen und auf Seite 62 zusammengefaßt. Es wurden nur diejenigen Werte berücksichtigt, die sich ohne den Zusatz von unmarkiertem VIP ergaben, sowie die bei Konzentrationen von unmarkiertem VIP im Bereich von 10^{-11} M bis einschließlich $4x10^{-9}$ M. Von den VIP-Werten ab über $5x10^{-9}$ M bis $5x10^{-8}$ M (mehr als das Hundertfache von 125J-VIP) wurde das Mittel gebildet, das dann als Maßzahl der unspezifischen Bindung von 125J-VIP in die Rechnung einging.

"B/F" wurde berechnet als Quotient von gebundener Aktivität minus NSB und zugesetzter minus gebundener Aktivität, "B" als der gebundene Anteil (Multiplikation mit dem Quotienten von gebundener Aktivität minus NSB und zugesetzter Aktivität) der Gesamtkonzentration von VIP (markiert und unmarkiert). Dazu wurde jeder einzelne experimentell gewonnene Datenpunkt verwendet, wie in den drei Graphen zu sehen. Durch lineare Regression wurde die gesuchte Gerade konstruiert, deren Steigung (K_D ist der negative Kehrwert) und Schnittpunkt mit der x-Achse (B_{max}: x-Achsen-Abschnitt) errechnet wurde.

In Abb.23 rechts unten sind die Ergebnisse der Analyse zusammengefaßt, wenn man, wie es meist in Bindungsstudien üblich ist, nur die Mittelwerte der Ergebnisse für die jeweiligen Konzentrationsstufen an unmarkiertem VIP berücksichtigt (wie z.B. oben, S.64, bei der Analyse der Sättigungsexperimente geschehen). Bei der meist üblichen Mittelwert-Analyse liegen die Korrelationskoeffizienten deutlich höher (eine Auswertung der Bindungsparameter wurde für diese "bereinigten" Ergebnisse nicht

vorgenommen).

Die Ergebnisse aus den drei Experimenten liegen im selben Größenordnungsbereich. Ihren Unterschieden könnten neben methodischen Problemen auch interindividuelle Unterschiede der Spender, z.B. Blutentnahmezeit, Ernährungszustand oder Geschlecht (vgl. Tab.2) zugrundeliegen. Die Ergebnisse der Kompetitionsstudien sind in Übereinstimmung mit der Analyse der Sättigungsstudien.

Die Tatsache, daß sich eine lineare Korrelation zwischen den Werten für "B/F" und "B" findet, der Graph also eine Gerade ist, spricht dafür, daß es sich nur um eine Klasse von Bindungsorten handelt.

Nach Würdigung kritischer Einwände in den letzten drei Abschnitten seien die bisherigen Überlegungen mit der folgenden Behauptung abgeschlossen:

Menschliche T-Lymphozyten (genauer: Non-B-Lymphozyten) tragen Rezeptoren für Vasoaktives Intestinales Peptid, die, wie andere (127) nachgewiesen haben, eine biologische Antwort, die Aktivierung von Adenylzyklase, auslösen.

5, Ergebnisse anderer VIP-Rezeptorbindungsstudien

Zum Vergleich mit der hier identifizierten Population von VIP-Rezeptoren sind Daten aus den vollständigeren Studien tabellarisch zusammengefaßt (Tab.5 und 6). Auch dem flüchtigen Betrachter wird angesichts der diskutierten Einflüsse methodischer Details klar, daß von einer Vergleichbarkeit in strengem Sinne nicht ausgegangen werden kann.

Überraschenderweise ergibt sich im Qualitativen der Bindungsstudien ein relativ einheitliches Bild (Tab.5):

125J-VIP bindet sich an das organische Substrat, der Zeitverlauf zeigt ein Plateau (bei 37°C oft im Bereich um 30 Minuten). Wo die nötigen Experimente durchgeführt wurden, zeigt sich die Gewebelinearität und Sättigbarkeit der Bindung. Die Bindung ist spezifisch, insofern als nur unmarkiertes VIP imstande ist, 125J-VIP zu verdrängen. Sekretin zeigt meist nur eine etwa 100 bis 1000mal geringere Potenz, während Glukagon und GIP ineffektiv sind. (Beim Anteil der spezifisch gebundenen Radioaktivität an der gesamten zugesetzten Radioaktivität finden sich größere Schwankungen mit einem Schwerpunkt bei ca. 5-15%) Die Bindung an das Substrat ist reversibel und 125J-VIP wird in den meisten Fällen beim Kontakt mit dem Bindungspartner abgebaut (wobei es keine einheitliche Auffassung über eine Schutzwirkung des herkommensgemäß zugefügten Aprotinins bzw. Bacitracins gibt; bejahend: 46, 72, leugnend: 27, 39). Für negative Kooperativität zwischen Bindungsorten gibt es keine Hinweise (39, 143).

Bei Vergleichen der quantitativen Auswertung der Kompetitionsstudien ist besondere Vorsicht geboten.

Erstens ist die spezifische Aktivität als Berechnungsgrundlage ein entscheidender Faktor. Wird sie fälschlicherweise zu niedrig angenommen, sind Kd und Bmax zu hoch. In dieser Studie liegt die spezifische Aktivität im Mittel ca. doppelt so hoch wie der häufig angegebene Wert von 250 Ci/g (zurückgehend auf 104).

Zweitens wird manchmal versucht, durch Addition der durch Abbau verlorenen gebundenen Aktivität die Meßwerte (in "echte Bindungswerte") zu bereinigen. Hier liegen einerseits nur unzureichende Daten zum 125J-VIP-Abbau vor, andererseits ist jede Manipulation an Meßwerten fragwürdig.

Drittens benützen einige Studien andere Daten als die Kompetitionsexperimente zur Errechnung der quantitativen Parameter (in Tab.5: 46 und 169, die kinetische und Sättigungsanalysen zugrundelegen).

Viertens gibt es selbst bei sehr ähnlichen Geweben keine Einigkeit bezüglich der Zahl der Rezeptorklassen (z.B. Rattenlebermembranen: 46, 81; Gehirnmembranen: 147, 169). Manche Studien finden gerade, andere gekrümmte ROSENTHAL-SCATCHARD-Graphen, obwohl manche Abbildungen wie die hier aus der Literatur entnommene (Abb.24 links) auch durch lineare Approximation interpretiert werden können. Dies gilt besonders angesichts der Tatsache, daß Ungenauigkeiten in der Bestimmung der unspezifischen Bindung zu ähnlich asymptotischen Kurvenverläufen führen können (37 vgl. 39). Viele Autoren bringen Dissoziationskurven als Argument in diese Diskussion ein.

Tabelle 5: Ausgewählte Bindungsstudien mit ^{125}J-VIP / Methoden

Gewebe Species/ Präparation	Vitalität	V I P	Spezifische Aktivität (Ci / g)	Inkubationsmedium pH	Puffer	Zusätze	Albumin	Protease-Inhibitor	Kompetitionsstudien Temperatur	Dauer	Trennung der Reaktionsprodukte	A u t o r
Lunge												
Me/gZ SW900	85%-	s	250	7,5	KRP	-	2% BSA	-	15C	150'	Z	(108)
Ra/hM	-	s	200-250	7,4	100mM TrisM	5mM $MgCl_2$	2% BSA	0,05% B 500 KU/ml A	37C	15'	Z	(148)
Pankreas (Acini)												
Ms/gZ	n.b.	n	240	7,4	KRBicarbonat	0,5mM $CaCl_2$ 14mM Gluk/^{2}AS	1% BSA	0,01% TI	37C	10'	Z	(39)
Leber												
Ra/hM	-	n	260-320	7,4	50mM TrisHCl	-	1,5% BSA	0,1% B	23C	60'	F	(46)
Ra/hM	-	n	200-250	7,0	50mM Trismaleat	5mM $MgCl_2$	1% BSA	0,05% B 100 KU/ml A	37C	30'	Z	(175)
Ra/hM	-	s	250	7,5	50mM TrisHCl	-	0,2% BSA	0,1% B	15C	90'	Z	(81)
Ra/gZ	n.b.	n.b.	n.b.	7,4	25mM KRHepes	-	1% Album.	0,1% B	37C	60'	n.b.	(72)
Gallenblasenepithel												
Me/gZ	n.b.	n	250	7,5	KRP	-	1,4% BSA	-	15C	90'	Z	(53)
Ms/gZ	n.b.	n	250	7,5	KRP	-	1,4% BSA	-	15C	60'	Z	(53)
Dünndarmepithel												
Ra/hM	-	n	200-250	7,5	25mM TrisHCl	-	0,2% BSA	0,1% B	30C	30'	F	(5)
Ra/hM basol.	-	n.b.	21(!)	7,4	α	α	1,4% BSA	1% B	n.b.	n.b.	Z	(47)
Ra/gZ	95%	n	250	7,5	35mM TrisHCl	50mM NaCl	1,4% BSA	0,1% B	15C	120'	Z	(143)
Ms/gZ	n.b.	n	160-230	7,4	αα	αα	1% BSA	0,1% B 0,01% TI	25C	20'	Z	(16)
Kolonepithel												
Me/gZ	90%	n	250	7,5	KRP	-	1,4% BSA	-	15C	45'	Z	(27)
Gehirn												
Ra/hM	-	n	190-250	7,4	50mM Hepes	5mM $MgCl_2$	1% BSA	0,000028B 3270 KU/mlA	37C	20'	Z	(169)
Ms/hM	-	n	n.b.	7,4	25mM TrisHCl	2mM $MgCl_2$ 0,1mM Mercapto-äthanol	0,5% BSA	0,025% B 500 KU/ml A	37C	10'	F	(147)
Zirkulierende Zellen												
Mononukleäre Zellen												
Me/gZ	90%-	s	250	7,5	35mM TrisHCl	50mMNaCl	1,4% BSA	0,1% B	15C	90'	Z	(80)
Molt 4b-Lymphoblasten												
Me/gZ	95%	s	280	7,4	25mM Hepes	RPMI 1640	2% HSA	-	37C	30'	Z	(11)
T-Lymphozyten												
Me/gZ	75%-	s	700	7,4	50mM Hepes	RPMI 1640	0,5% HSA	-	37C	30'	Z	hier

a: 1,6mM TrisHepes; 17mM TrisHCl; 19,2mM $Na-PO_4$-Puffer; 77mM NaCl; 3,3mM KCl; 0,6mM $MgCl_2$; 0,6mM $CaCl_2$; 3,3mM l-Glutamin; 54mM Mannitol; 1,3mM D-Glukose.

aa: 24,5mM Hepes; 2,5mM NaH_2PO_4; 98mM NaCl; 6mM KCl; 1mM $MgCl_2$; 0,5mM $CaCl_2$; 5mM Na-Pyruvat; 5mM Na-Fumarat; 5mM Na-Glutamat; 11,5mM Glukose; 2mM Glutamin; 1% Aminosäurenlösung; 1% Vitaminlösung; 1mM Theophyllin.

Ra: Ratte, Ms: Meerschweinchen; Me: Mensch. hM: homogenisierte Membranen; gZ: ganze Zellen. s: synthetisch; n: natürlich.

KR: Krebs-Ringer; KRP: KP-Phosphat; TrisM: Trismaleat. Gluk/AS: Glukose-Aminosäuregemisch. Album.: Albumin; B: Bacitracin; KU: Kallikrein inhibiting units; A: Aprotinin (Trasylol®); TI: Trypsin-Inhibitor; Z: Zentrifugation; F: Filtration.

Tabelle 5: Auswahlliste Bindungsstudien mit ^{125}J-VIP / Ergebnisse

Temperaturabhängigkeit	Plateau der Bindung bei 37C (von bis)	Reversibilität	Degradation	Proportionalität zur Rezeptorkonz.	Sättigung gezeigt?	Kompetitionsexperimente: Spez. Bindung als Teil der zugesetzten Radioaktivität	Unspezifische Bindung (% der zugesetzten A.)	Klassen von Bindungsorten	Bindungsparameter: Affinität K_D	Bindungsorte pro Zelle	Kompetitive Potenz: Sekretin	Glukagon	GIP	Autor
+	n.b.	n.b.	+	+	n.b.	n.b.	10%	2	0,34 nM 61,4 nM	27600 1062000	1/5000	-	-	(108)
+	15'-30'	+	+	n.b.	n.b.	6-8%	1,5%	1-	n.b.	n.b.	1/100	-	nb	(148)
+	10'-40'	+	+	n.b.	n.b.	18%	3%	2	0,7 nM 80 nM	9000 135000	1/10000	-	nb	(39)
+	5'-30'	+	+	+	+	n.b.	8-10%	1	0,16 nM	n.b.	1/100	nb	nb	(46)
n.b.	30'-	n.b.	+	n.b.	n.b.	8-15%	8%	2	0,8 nM 9 nM	n.b.	1/100	nb	nb	(175)
+	n.b.	+	+	+	n.b.	15%	3-4%	2	0,42 nM 170 nM	n.b.	1/60	-	nb	(81)
n.b.	n.b.	+	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1	3 nM	500000	1/100	-	nb	(72)
+	20'	+	+	n.b.	n.b.	6%	1%	2	1,3 nM 16,2 nM	62000 510000	1/1000	-	-	(53)
n.b.	20'	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	50%	3%	2	0,8 nM 22 nM	n.b.	1/5000	nb	nb	(53)
+	n.b.	+	+	+	n.b.	15%	2%	2	0,28 nM 152 nM	5300 1100000	1/1000	-	-	(5)
+	n.b.	n.b.	-	+	n.b.	2%	1%	1	20 nM	71000	1/100	nb	nb	(47)
+	n.b.	+	+	+	n.b.	4%	1%	2	1,6 nM 74 nM	140000 1100000	1/70	-	-	(143)
+	n.b.	+	n.b.	n.b.	n.b.	4%	2%	1	12 nM	58000	1/100	-	nb	(16)
+	n.b.	+	+	+	n.b.	2%	2%	2	1,4 nM 46 nM	26000 400000	1/1000	-	-	(27)
n.b.	20'-30'	+	n.b.	+	+	n.b.	n.b.	1	1 nM	n.b.	1/100	-	nb	(169)
+	5'-15'	+	n.b.	n.b.	n.b.	12%	3,5%	2	36 nM 285 nM	n.b.	1/200	-	nb	(147)
+	n.b.	+	+	n.b.	n.b.	4%	1%	2	0,24 nM 80 nM	4800 480000	1/400	-	nb	(80)
um 15°	+	+	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1	7,3 nM	15000	1/10000	-	nb	(11)
+	30'-45'	+	+	+	+	5-7%	1%	1	0,4 nM	1100	-	-	-	hier

Aus einem zweiphasigen, gekrümmten Verlauf wird auf verschieden schnelle Dissoziationsprozesse zweier Rezeptorklassen geschlossen. Auch hier bleiben bei mancher Abbildung Zweifel, ob lineare Approximation den Datenpunkten nicht genau so gerecht wird (vgl. Abb.24 rechts).

Eine weitere Interpretation der Existenz von zwei Rezeptorklassen ist möglich, wenn man annimmt, daß die Rezeptoren auf verschiedene Fraktionen einer nicht homogenen Zellpräparation aufgeteilt sind (vgl. S.106). Dafür sind als Beispiel Bindungsstudien am Dünndarmepithel der Ratte anzuführen, wo in ganzen Zellen (143) und in Membranpräparationen (5) zwei Rezeptorklassen beschrieben wurden, wo aber bei einer weiteren Fraktionierung des Gewebes (Fraktion der basolateralen Membranen) die Daten nur für eine Klasse sprechen (47).

Der hier errechnete Wert für Kd ist am ehesten mit dem für die Rezeptorklassen hoher Affinität aus anderen Studien zu vergleichen. Der Wert liegt gut in deren Bereich um 0,1 bis 1nM. Worin die Ergebnisse am wenigsten mit anderen Studien übereinstimmen, ist die Anzahl der Bindungsorte. Es läßt sich fragen, ob die relativ geringe Zahl von 1136 pro Zelle eher methodisch bedingt ist oder, ob sie besondere biologische Zustände oder Eigenschaften von Blutzellen widerspiegelt (vgl. Tabellen 5, 6 und 7).

In den hier gezeigten Kompetitionsexperimenten (Abb.16 und 17) konnten hohe Konzentrationen von GIP, Glukagon und Sekretin die VIP-Bindung an die Zellen nicht beeinflussen. Im Vergleich zu den anderen Studien verwundert das nur bei Sekretin, dessen

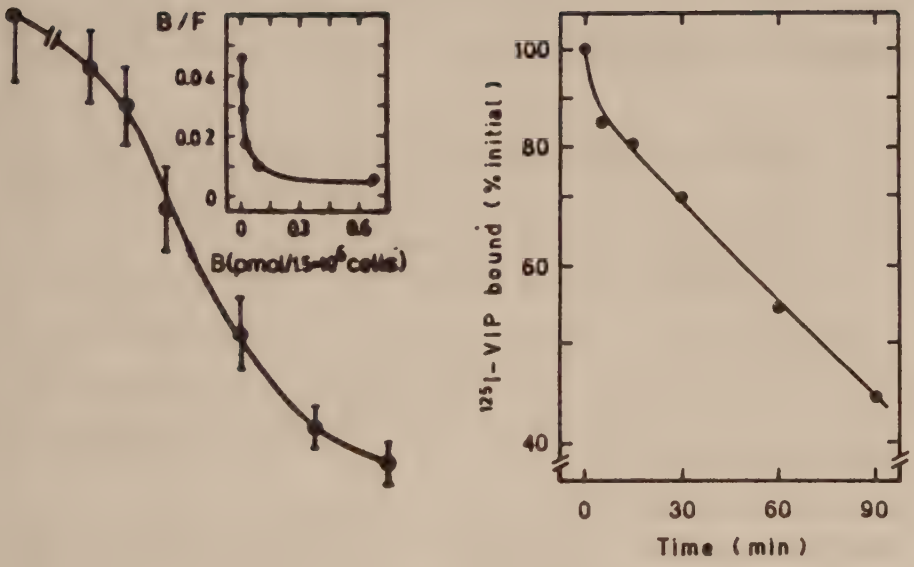

Abbildung 24

Graphen aus der Studie zur Bindung von 125J-VIP an mononukleäre Zellen (Fig.3 und 2 aus 80)

kompetitive Potenz meist im Bereich von 1/1000 liegt, hier aber kleiner als 1/10000 sein muß. Der genaue Wert war mit den verwendbaren Sekretin-Konzentrationen nicht zu bestimmen. Bei T-Lymphoblasten scheint er bei 1/10000 zu liegen (11), ein ähnlich hoher Wert (1/5000) ist nur noch in menschlichen Lungentumor-Kulturen bekannt (108).

Bei den Ergebnissen der Enzymstudien reicht das Vermögen von VIP zur Steigerung der Adenylzyklase-Aktivität vom Doppelten des Basiswertes bis zum 100fachen. Halbmaximale Aktivität wird meist im Bereich von 0,1 bis 5nM VIP ausgelöst. (Eine einzige Studie ist bekannt, in der VIP das Enzym hemmt: In einer Kultur von Gehirngefäß-Endothelien der Ratte beträgt die Aktivität der Adenylzyklase bei Inkubation mit 1uM VIP nur noch ein Zehntel des Ausgangswertes)(102).

Besonders schwierig ist es, Adenylzyklase-Studien mit Bindungsstudien desselben Systems zu vergleichen. In nur einer Arbeit sind die Inkubationsbedingungen für beide Untersuchungen identisch (16, nur eine Abweichung: 53). Damit gibt es wenig Anhaltspunkte für das "stimulus response coupling" der VIP-Rezeptoren. Die Daten sprechen am ehesten für das "spare receptors"-Konzept (16, 27, 53, 106). Das äußert sich in den Tabellen 5 und 6 so, daß die halbmaximale Wirkdosis ED_{50} für die Adenylzyklase erheblich kleiner als die Bindungsaffinität K_D ist, die ja auch der Ligandenkonzentration entspricht, bei der die Hälfte der Bindungsorte mit Ligand besetzt ist (vgl. Abb.22).

Unter den Arbeiten mit Leukozyten (mononukleäre Zellen bzw. Lymphozyten) sind die Bindungsdaten von Guerrero et al.(80) besser mit seinen Adenylzyklase-Daten zu vergleichen als die hier erarbeiteten mit denen der Enzym-Studie von O´Dorisio et al. (127), zumal da im letzteren Fall nicht nur die Bedingungen der Inkubation, sondern auch die der Zellpräparation voneinander abweichen.

Beim Vergleich der numerischen Ergebnisse ergeben sich allerdings keine großen Unterschiede:

Autor	Guerrero et al. (80)	O'Dorisio et al. (127) und hier
Rezeptorklassen	2	1
K_D	0,240 nM (hochaffin)	0,445 nM
Bindungsorte/Zelle	4800 (hochaffin)	ca. 1100
Stimulation der Adenylzyklase über Ausgangswert (max.)	2fach	4fach

Ungeklärt bleibt die Frage nach der Zahl der Rezeptorklassen für VIP auf Leukozyten. Auf mononukleären Zellen der Ratte sollen ebenfalls 2 Rezeptorklassen für VIP existieren (mit K_D von 0,1nM bzw. 170nM)(33), während T-Lymphoblasten nur eine Klasse tragen sollen (11). Aber auch für andere Gewebe sind solche Widersprüche nicht aufgelöst (31, 147, 169). Auf die Argumente Dissoziationsstudie und SCATCHARD/ROSENTHAL-Analyse wurde schon eingegangen (S.97, 100 und Abb.24), zusätzlich ist auf den monophasischen Verlauf der Adenylzyklase-Aktivierungskurve zu verweisen (Abb. 18), der eher für nur eine Rezeptorklasse spricht.

Tabelle 6: Ausgewählte Adenylzyklase-Studien mit VIP / Methoden

Gewebe Spezies/ Präparation	V I P	Inkubationsmedium pH	Puffer	Salze	Zusätze	Inhibitor der Phosphodiesterase	Dosis-Wirkungs-Studien Temperatur	Dauer	A u t o r
Lunge									
Me/gZ SW900	s	7,5	KRP	-	2% BSA	o,5mM IMX	15C	30'	(108)
Ra/hM	s	7,5	30mM TrisHCl	5mM $MgCl_2$	0,5mM EGTA	1mM Theoph.	37C	8'	(148)
Pankreas (Acini)									
Ms/gZ	n	7,4	KRBicarbonat	0,5mM $CaCl_2$	1% Album.	5mM Theoph.	37C	15'	(146)
Leber									
Ms/gZ	n	7,5	30mM TrisHCl	5mM $MgCl_2$	0,5mM EGTA	1mM Theoph.	37C	10'	(175)
Gallenblasenepithel									
Me/gZ	n	7,5	KRP	-	1,4% BSA	-	15C	60'	(53)
Ms/gZ	n	7,5	KRP	-	1,4% BSA	-	15C	60'	(53)
Dünndarmepithel									
Ra/hM	n	7,5	25mM TrisHCl	-	0,4% BSA 0,02% Bacitracin 1mM EDTA	0,2mM IMX	30C	15'	(1)
Ra/gZ	n	7,5	35mM TrisHCl	50mM NaCl	1,4% BSA o,1% Bacitracin	0,2mM IMX	15C	45'	(106)
Ms/gZ	n	7,4	24,5mM Hepes	α	α	5mM Theoph.	25C	20'	(16)
Colonepithel									
Me/gZ	n	7,5	35mM TrisHCl	50mM NaCl	1,4% BSA	0,2mM IMX	15C	60'	(52)
Zirkulierende Zellen									
Mononukleäre Zellen									
Me/gZ	s	7,5	35mM TrisHCl	50mM NaCl	1,4% BSA 0,1% Bacitracin	0,2mM Theoph.	15C	45'	(80)
Molt 4b-Lymphoblasten									
Me/gZ	s	7,4	25mM Hepes	-	2% HSA RPMI 1640	1mM IMX	17C	5'	(11)
Lymphozyten									
Me/hM	s	7,7	100mM TrisHCl	2mM $MgCl_2$	0,04% BSA	10mM Theoph.	37C	15'	(127)

: 2mM NaH_2PO_4; 98mM NaCl; 6mM KCl; 1mM $MgCl_2$; 0,5mM $MgCl_2$; 5mMNa-Pyruvat; 5mM Na-Fumarat; 5mM Na-Glutamat; 11,5mM Glukose; 2mM Glutamin; 1% BSA; 0,1% Bacitracin; 0,01% Trypsin-Inhibitor; 1% Aminosäurelösung; 1% Vitaminlösung.
ei Membranpräparationen sind stets noch die Substrate der Adenylzyklase zugesetzt.
eaktionsgleichgewicht lag meist vor: nicht bestimmt wurde es bei 148, 175, 3, 101, 10.
denylzyklase wurde außer bei148, 146, 175 und 79 mit Radioimmunassay gemessen.

okürzungen: zum Teil wie in Tabelle 5. SW900: Lungentumorkultur SW900; Theoph.: Theophyllin; IMX: Isobutylmethylxanthin.

Tabelle 6: Ausgewählte Adenylzyklase-Studien mit VIP / Ergebnisse

Temperaturabhängigkeit	Plateau der Reaktion bei 37C (von bis)	maximale Aktivitätssteigerung	halbmaximale Wirkdosis ED_{50}	Aktivierungsverlauf mono/ biphasisch	Potenz verwandter Substanzen Sekretin	Glukagon	G I P	A u t o r
+	n.b.	x3,5	0,3nM	mo	1/6000	-	-	(108)
n.b.	n.b.	x2,5	ca.0,2nM und 10nM	bi	1/100	nb	nb	(148)
n.b.	5'-15'	x6	0,4nM und 100nM	bi	x1000(!)	-	-	(146)
n.b.	n.b.	x3,8	3nM	mo	1/100	-	-	(175)
+	30'-45'	x100	0,2nM	mo	1/10000	-	-	(53)
n.b.	30'-45'	x22	0,1pM und 2nM	bi	1/1	nb	nb	(53)
n.b.	n.b.	x6	4,1nM	mo	1/1000	nb	nb	(4)
+	n.b.	x11	2,3nM	mo	1/120	-	-	(106)
n.b.	n.b.	x20	1nM	mo	1/200	-	nb	(16)
+	10'	x21	1,2nM	mo	1/2500 PHI:1/600	-	-	(52)
+	n.b.	x4	0,1nM	mo	1/7000	-	nb	(80)
n.b.	n.b.	x5	10nM	n.b.	n.b.	nb	nb	(11)
+	15'-30'	x2,4	ca.0,2nM	mo	n.b.	nb	nb	(127)

Andererseits existieren bei Guerrero et al. (80), da dort eine höhere Inhomogenität der Zellen herrscht, möglicherweise tatsächlich zwei verschiedene Rezeptorklassen - nur eben auf unterschiedlichen Zellen. Seine Rezeptoren hoher Affinität dürften den hier nachgewiesenen Rezeptoren auf T-Lymphozyten entsprechen, und die, vielleicht mit Monozyten verbundenen, Rezeptoren niederer Affinität sind hier durch Separationsschritte abgetrennt worden.

Daran, daß bei Guerrero mononukleare Zellen als Einheit behandelt werden, setzt die stärkste Kritik an. Es wird behauptet, die Ergebnisse seien unabhängig von der Zusammensetzung der verwendeten Zellpräparation (80, p.158):

"Although the cell preparation used is relatively heterogenous, it should be noted, that the results were similar when different ratios of B and T lymphocytes and monocytes were used or when experiments were conducted on preparations of isolated B or T lymphocytes. This result suggests that the binding sites for VIP and the VIP-dependent adenylate cyclase are expressed in the 3 classes of mononuclear cells present in the preparations used."

Demgegenüber haben O´Dorisio et al. (127) gezeigt, daß die mononukleären Subpopulationen sich sehr wohl in ihrer Empfindlichkeit gegenüber VIP unterscheiden. Nur die Adenylzyklase von Lymphozyten reagiert auf VIP, und es ist zu postulieren, daß sich Unterschiede zwischen den Blutzell-Subpopulationen auch in ihrer Ausstattung mit Bindungsorten finden (wie z.B. für Somatostatin-Bindung beschrieben)(15). Diese Erörterung von Vergleichsdaten soll mit

Zellpopulation	Ligand	Bindungsorte/Zelle	(Autor)
Erythrozyten	Insulin	2000	(71)
Granulozyten	Insulin	1000	(68)
Neurophile	β-Agonist (DHA)	1800	(51)
	β_2-Agonisten	1000-2000	(113)
Mononukleäre Zellen	Angiotensin II	181 bzw. 2312	(162)
	VIP	4800 bzw. 480000	(80)
Monozyten	Somatostatin	450-500	(15)
	Glukagon	2-4	(15)
Lymphozyten	Somatostatin	220-250	(15)
	Insulin	350 bzw. 1700	(73)
	Prostaglandin $E_{1,2}$	ca. 200	(77)
	β_2-Agonisten	1000-2000	(113)
	Calcitonin	100-600	(115)
	VIP	ca. 1100	(hier)
T-Lymphoblasten	VIP	15000	(11)

Tabelle 7:

Rezeptoren auf Blutzellen vom Menschen

einem tabellarischen Hinweis auf Rezeptoren für andere Substanzen auf menschlichen Blutzellen abgeschlossen werden (s. Tab.7). Besonders fällt auf, daß die Zahl der Bindungsorte für Überträgerstoffe auf Blutzellen relativ gering ist, wenn man z.B. Rezeptoren in Darm oder Leber damit vergleicht (Tab.5).

Insgesamt, wenn auch Reibungspunkte vorhanden sind, sind die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten vor dem Hintergrund der relevanten Literatur plausibel.

6, Überlegungen zur Funktion

Was die Funktion des beschriebenen Rezeptor-Systems für VIP auf T-Lymphozyten betrifft, so betreten wir das Gebiet der Spekulation.
Zuvor Allgemeines zum Abwehrsystem des Organismus (s. auch 13): Unspezifische Abwehr in Form von Entzündung oder Phagozytose wird vor allem von Monozyten und Granulozyten getragen, während die spezifische Abwehr durch Lymphozyten ermöglicht wird. Die genauen Vorgänge des Zusammenspiels der verschiedenen Zellen beim Zustandekommen der Immunantwort sind erst in Ansätzen aufgeklärt, aber es scheint sicher, daß erst Zellen der unspezifischen Abwehr (z.B. Makrophagen) mit Lymphozyten zusammen die Antwort ermöglichen.
Zur Funktion von Peptidrezeptoren auf Lymphozyten (vgl. Tab.7) finden sich in der Literatur kaum Vorstellungen. Eine Monographie

dazu (74) betont lediglich den Aspekt, daß sich diese leicht zugänglichen Zellen als gute Indikatoren für Zustände von Rezeptoren anderer Gewebe eignen; Lymphozytenrezeptoren für Insulin sollen nach anderer Auffassung (89) eine besondere Funktion während der Zelltransformation ausüben: dann nämlich vermehrt sich ihre Zahl sehr stark.

Drei Möglichkeiten der Funktion scheinen in Frage zu kommen:

1, die Rezeptoren sind funktionslose Relikte einer "Urahnzelle",

2, sie dienen zum Abfangen und Abbau zirkulierender Hormone oder

3, sie beeinflussen mit Hilfe gängiger Mechanismen der jeweiligen Überträgerstoffe (s. S.16) spezifische Funktionen der zirkulierenden Zielzellen.

Für die Funktion des VIP-Rezeptorsystems favorisiere ich die Annahme, daß VIP Bestandteil eines Kommunikationssystems zwischen Zellen des Abwehrsystems ist. Zyklisches AMP, als "second messenger", ist an zahlreichen Lebensvorgängen von Lymphozyten beteiligt, höchstwahrscheinlich auch an ihrer Reifung (136, 179). Hier kommt VIP als "first messenger" in Frage, denn auch für den Reifungsprozeß von Enterozyten und Pankreaskarzinomzellen ist eine Steuerung über VIP und cAMP nahegelegt (9, 60). Die starke Vermehrung von VIP-Bindungsorten bei T-Lymphoblasten (Molt 4-Zellen) spricht für die Annahme (11). Mit der Beschreibung der Aktivierung von cAMP-abhängiger Proteinkinase in menschlichen mononukleären Zellen (82) als möglichem nächsten Schritt in der Sequenz zwischen Signal und Zellantwort verdichten sich die Hinweise auf eine Funktion von VIP für zirkulierende Zellen.

Bezüglich der Quelle des VIP-Signals und des Ortes seiner Übermittlung sind mehrere Möglichkeiten überlegenswert. Im immunologischen Steuerorgan Thymus (bei Ratte und Mensch) ist VIP nicht meßbar (33, 131) und Thymozyten scheinen keine Rezeptoren zu tragen (33). Gegen ein Stattfinden der Reaktion im systemischen Kreislauf spricht, daß die Plasmaspiegel von VIP beim Gesunden mit 15 - 52 pM (103) nur etwa ein Zehntel der hier berechneten Affinitätskonstanten betragen.
Bei lokaler Freisetzung aber sollten sicher höhere Konzentrationen, die sowohl die Bindungsreaktion bewirken, als auch die Adenylzyklase stimulieren, erreichbar sein. Möglicherweise wird VIP aus neutrophilen Granulozyten entspeichert (126) oder auch aus deren Vorstufen im Knochenmark (65). Auch VIP-haltige Nervenfasern um Blutgefäße könnten eine Quelle des Liganden sein (56, 135), wichtig vielleicht vor allem dann, wenn zirkulierende Zellen zu Entzündungsherden auswandern.

Zahlreiche Autoren postulieren eine Regulation von Immunreaktionen durch das Nervensystem (110). Die Existenz von vegetativen Nervenfasern an Orten der Lymphozytenreifung (Knochenmark, lymphoides Gewebe im Darm) ist vielleicht Grundlage dafür (85, 133). Da VIP höchstwahrscheinlich ein Transmitter im autonomen Nervensystem ist (67) und z.B. im Nervengewebe des Darmtrakts vorkommt (63), schlage ich als dritte Hypothese vor, VIP auch als Signalsubstanz zwischen Nervensystem und Immunsystem, speziell dem des Darms, in Betracht zu ziehen.

Interessanterweise scheinen auch andere gastrointestinale Peptide an immunologischen Prozessen mitzuwirken: zuvor parenteral sensibilisierte Versuchstiere reagieren auf enteralen Kontakt zum selben Antigen mit einer Ausschüttung von Gastrin (170) und systemischer Immunantwort (159). Nicht-sensibilisierte Tiere reagieren mit einer lokalen Immunantwort und mit systemischer Immuntoleranz, bei deren Zustandekommen möglicherweise T-Lymphozyten eine Rolle spielen (159). Des weiteren ist auffällig, daß i.m. Applikationen von Gastrin und Sekretin bei Ratten und Mäusen zu Blutbildveränderungen führen, insbesondere führt Pentagastrin zur Verringerung von T-Lymphozyten (140).
Für Substanz P, Endorphine und Met-Enkephalin sind stimulierende Effekte auf Lymphozyten beschrieben, bei Substanz P Effekte auf T-Lymphozyten (137).

Die Minimalhypothese zur Existenz des beschriebenen Rezeptors formuliere ich so: So wie es möglich ist, an zahllosen Zellen, die nicht zu Zielorganen eines Hormons gehören, Hormonrezeptoren nachzuweisen, könnte es sich auch in unserem Fall um eine Art "Erinnerung" der Genexpression an den Zustand der omnipotenten Zelle handeln. Die Zellen tragen also Spuren einer speziellen, von ihnen nicht mehr ausgeübten Funktion, vergleichbar dem menschlichen Wurmfortsatz. Angesichts der inflationär zunehmenden Zahl von Rezeptorbindungsstudien wäre durch die Annahme solcher Relikte ohne funktionelle Bedeutung eine Besinnung auf den wahren Wert dieser Studien für die Biologie möglich (84).

7, Klinische Aspekte und Ausblick

Daß die Beschäftigung mit VIP klinisch-diagnostischen Wert hat, ist aus der Erwähnung des Verner-Morrison-Syndroms bzw. "Vipoms" klar. Trotz noch nicht endgültig geklärter pathogenetischer Zusammenhänge ist die radioimmunologische Bestimmung von VIP in der Differentialdiagnose von exzessiver Diarrhoe, Glukoseintoleranz und "flush" von einiger Bedeutung (160): Sie zieht differentialtherapeutische Konsequenzen nach sich (64, 112, 113). Offenbar hat VIP auch eine Bedeutung als Tumormarker bei neurogenen Tumoren des Kindesalters, selbst wenn dabei keine Diarrhoe auftritt (171).

Die hier vorgestellten Daten machen es interessant, in den genannten Patientengruppen mit erhöhten VIP-Plasmaspiegeln nach Besonderheiten des Immunsystems zu suchen. Aussichtsreich erscheint eine Suche nach pathologischen Befunden der peptidergen Innervation und des Immunsystems vor allem bei Patienten, die im Rahmen der multiplen endokrinen Neoplasie (MEN) sowohl Träger endokrin aktiver Pankreastumoren als auch eines Thymus-Karzinoids sind (55).

Ein weiteres Anwendungsgebiet der entwickelten Methodik ist die psychiatrische Forschung. Eine ihrer Hoffnungen besteht darin, Vorgänge an Rezeptoren des ZNS (z.B. Zunahme oder Abnahme ihrer Dichte oder Empfindlichkeit) an leicht zugänglichen Rezeptoren, die sich eventuell analog verhalten, zu studieren. Wie erwähnt, bieten sich dafür Blutzellen als Rezeptorquelle ganz besonders an (74). Warum VIP für die Psychiatrie von besonderem Interesse ist,

liegt neben seinem Vorkommen in Zellen der Hirnrinde (118) vor allem am Nachweis von VIP in Zellen des Nucleus suprachiasmaticus. Dieser Kern gehört zu einem Bahnsystem, das die Tagesrhythmik des Organismus steuert (117). Bekanntlich stehen deren Störungen bei der Gruppe der Zyklothymien im Vordergrund des gegenwärtigen Forschungsinteresses.
Für die Hämatologie hatte sich aus den Funden von VIP in neutrophilen Granulozyten und Knochenmarkszellen eine Anwendungsmöglichkeit gezeigt: VIP als differentialdiagnostischer Marker bei Leukämien (65, 120, 126).

Verschiedene jüngere Studien erlauben es, in Andeutungen ein Kommunikationssystem zwischen zirkulierenden Zellen zu entwerfen. Auch hier scheint eine neue Hypothese zuzutreffen: die Hypothese von der Existenz nicht nur eines Transmitters, über den einzelne Zellen verfügen können (114). Das gemeinsame Vorkommen mehrerer Transmitter, das jüngst für Zellen des Endokriniums und des Nervensystems beschrieben wurde, scheint eine allgemeine Eigenschaft von Zellen zu sein. Nicht anders ist wohl der Nachweis von Histamin und VIP in Ratten-Mastzellen zu interpretieren (44).
Wie erwähnt (Tab.7), sind auf Lymphozyten zahlreiche Rezeptoren beschrieben, die Wirkungen von Überträgerstoffen vermitteln könnten. Als Beispiel für die dadurch mögliche funktionelle Kopplung der großen Regulationssysteme des Organismus (Immunsystem, Nervensystem, Endokrinium) sei das von Makrophagen gebildete Protein LAF genannt, das besonders durch seine

weitreichenden Wirkungen von Interesse ist. Neben der immunstimulierenden Wirkung (LAF = Lymphozyten aktivierender Faktor) soll es Wirkungen auf den Stoffwechsel haben (Leber: Proteinsynthese, Muskulatur: Katabolismus, Pankreas: Glukagon- und Insulinfreisetzung) und durch Wirkung im Hypothalamus Fieber auslösen können (12, 142).
In diesem Zusammenhang läßt das weite Spektrum der Wirkungen von VIP (Tab.1) es als durchaus möglich erscheinen, daß VIP oder ein ähnliches Peptid (Vorläufermolekül?) eine vergleichbare Rolle als Überträgersubstanz mit weitreichenden Koordinationsaufgaben spielt.

Auf jeden Fall erscheint es lohnend, die Rolle weiter zu erhellen, die VIP vielleicht in Immunprozessen, im Entzündungsgeschehen und in der Lymphozytendifferenzierung hat. Erst kürzlich (33) ist für diese Fragestellung ein Tiermodell vorgestellt worden.

VI, Zusammenfassung

Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) stimuliert die Adenylzyklase in Lymphozytenmembranen. Dies legt die Existenz von spezifischen Rezeptoren für VIP nahe. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob die Existenzkriterien von Rezeptoren für VIP auf T-Lymphozyten vom Menschen (genauer: Non-B-Lymphozyten) erfüllt sind.

Nach Böyum wurden mononukleäre Zellen isoliert, von diesen die Monozyten und B-Lymphozyten durch Adhärenz an Nylonwolle abgetrennt. Mit 125J markiertes VIP diente in Bindungsstudien als "tracer".

Aufgrund der Ergebnisse der Bindungsstudien und der bekannten Wirkung auf Adenylzyklase zeigt sich, daß die Existenzkriterien für Rezeptoren erfüllt sind: Die Bindung von 125J-VIP an die isolierten Zellen ist von Temperatur und Inkubationsdauer abhängig. Die Bindung erfolgt rasch und ist reversibel. Sie ist linear von der Konzentration der Zellen abhängig. Unmarkiertes VIP konkurriert mit 125J-VIP um die Bindung. Sekretin, Glukagon und GIP zeigen keine Konkurrenz mit 125J-VIP um die Bindung.

Die aus den Kompetitionsstudien berechneten Parameter Kd und Bmax ergeben eine hohe Affinitätskonstante von ca. 0,5nM und eine Zahl von ca. 1100 Bindungsorten pro Zelle. Eine biologische Antwort (Adenylzyklase-Stimulation) ist bekannt.

VIP zeigt also spezifische Wechselwirkungen mit Zellen des Immunsystems. Ob damit der peptiderge Neurotransmitter VIP einen Einfluß auf Immunprozesse ausüben kann, ist die interessante, weiterführende Frage.

Literaturverzeichnis

1, Ahren B.,Alumets J.,Ericsson M.,Fahrenkrug J.,Fahrenkrug L., Håkanson R., Hedner P., Loren I., Melander A., Rerup C., Sundler F.;
VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thyroid hormone secretion;
Nature 287: 343-345 (1980)

2, Aiuti F., Cerottini J.-C., Coombs R., Cooper M., Dickler H., Froland S., Fudenberg H., Greaves M., Grey H., Kunkel H., Natvig J., Preud´homme J., Rabelinno E., Ritts R., Rowe D., Seligmann M., Siegal F., Stjernsward J., Terry W., Wybran J.;
International Union of Immunological Societies (IUS), Report - July 1974: identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood;
Clin. Immunol. Immunopathol. 3: 584-597 (1975)

3, Akera T., Cheng V.-J.K.;
A simple method for the determination of affinity and binding site concentration in receptor binding studies;
Biochim. Biophys. Acta 470: 412-423 (1977)

4, Amiranoff B., Laburthe M., Dupont C., Rosselin G.;
Characterization of a vasoactive intestinal peptide-sensitive adenylate cyclase in rat intestinal epithelial cell membranes;
Biochim. Biophys. Acta 544: 474-481 (1978)

5, Amiranoff B., Laburthe M., Rosselin G.;
Characterization of specific binding sites for vasoactive intestinal peptide in rat intestinal epithelial cell membranes;
Biochim. Biophys. Acta 627: 215-224 (1980)

6, Archer J.A., Gorden P., Gavin J.R.III, Lesniak M.A., Roth J.;
Insulin receptors in human circulating lymphocytes: application to the study of insulin resistance in man;
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36: 627-633 (1973)

7, Basso N., Lezoche E., Speranza V., Walsh J.H. (eds.);
International symposium on brain-gut axis: the new frontier;
Florence 1981

8, Bataille D., Freychet P., Rosselin G.;
Interactions of glucagon, gut glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver and fat cell plasma membranes: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase;
Endocrinology 95: 713-721 (1974)

9, Battikhi Q.G.O., Hearn P.R., Brown B.L., Russell R.G.G.;
The cyclic AMP response to hormones of isolated enterocytes at different stages of crypt to villus maturation;
Regul. Pept. Suppl.1: S9 (1980)

10, Baxter J.D., Funder J.W.;
Hormone receptors;
N. Engl. J. Med. 301: 1149-1161 (1979)

11, Beed E.A., O´Dorisio M.S., O´Dorisio T.M., Gaginella T.S.;
Demonstration of a functional receptor for vasoactive intestinal polypeptide on Molt 4b T lymphoblasts;
Regul. Pept. 6: 1-12 (1983)

12, Beisel W.R.;
Mediators of fever and muscle proteolysis;
N. Engl. J. Med. 308: 586-588 (1983)

13, Bellanti J.A. (ed.);
Immunology II;
Philadelphia, Saunders (1978)

14, Bennett J.P.;
Methods in binding studies; S.57-90 in:
Yamamura H.I., Enna S.J., Kuhar M.J.;
Neurotransmitter receptor binding;
New York, Raven (1980)

15, Bhathena S.J., Louie J., Schechter G., Redman R., Wahl L., Recant L.;
Identification of human mononuclear leucocytes bearing receptors for somatostatin and glucagon;
Diabetes 30: 127-131 (1981)

16, Binder H.J., Lemp G.F., Gardner J.D.;
Receptors for vasoactive intestinal peptide and secretin on small intestinal epithelial cells;
Am. J. Physiol. 238: G190-G196 (1980)

17, Bishop A.E., Polak J.M., Green I.C., Bryant M.G., Bloom S.R.;
The location of VIP in the pancreas of man and rat;
Diabetologia 18: 73-78 (1980)

18, Bloom F.E.;
Neuropeptides;
Sci. Am. 245: 148-168 (1981)

19, Bloom S.R. (ed.);
Gut hormones;
Edinburgh, Churchill Livingstone (1,1978)

20, Bloom S.R.;
Vasoactive intestinal peptide; S.553-565 in:
Jaffe B.M., Behrman H.R. (eds.);
Methods of hormone radioimmunoassay;
New York, Academic Press (2,1979)

21, Bloom S.R., Polak J.M. (eds.);
Gut hormones;
Edinburgh, Churchill Livingstone (2,1981)

22, Bodanszky M., Klausner Y.S., Yanglin C., Mutt V., Said S.I.;
Synthesis of the vasoactive intestinal peptide (VIP);
J. Amer. Chem. Soc. 96: 4973-4978 (1974)

23, Böyum A.;
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood;
Scand. J. Clin. Lab. Invest. (Suppl.) 97: 77-88 (1968)

24, Bolton A.E.;
Radioiodination techniques;
Arlington Heights, Amersham Corporation (o.J.)

25, Brasitus T.A.;
Vasoactive intestinal polypeptide preferentially binds to basolateral membranes of enterocytes;
Gastroenterology 85: 481-482 (1983)

26, Brown J.C., Frost J.L., Kwauk S., Otte S.C., McIntosh C.H.S.;
Gastric inhibitory polypeptide (GIP): isolation, structure, and basic functions; S.223-232 in: 75

27, Broyart J.-P., Dupont Ch., Laburthe M., Rosselin G.;
Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in human colonic epithelial cells;
J. Clin. Endocrinol. Metab. 52: 715-721 (1981)

28, Bryant M.G., Polak J.M., Modlin I., Bloom S., Albuquerque R., Pearse A.G.E.;
Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance;
Lancet 1: 991-993 (1976)

29, Buchanan K.D.(ed.);
Gastrointestinal hormones;
Clin. Endocrinol. Metab. 8(2): 247-449 (1979)

30, Burt D.R.;
Basic receptor methods, II. Problems of interpretation in binding studies; S.53-69 in: 165

31, Burt D.R., Rossie S.S., Miller R.J.;
Peptide receptor methodology; S.150-167 in: 165

32, Bylund D.B.;
Analysis of receptor binding data; S.70-69 in: 165

33, Calvo J.R., Guerrero J.M., Molinero P., Goberna .;
Receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) in lymphoid cells of rat;
Regul. Pept. 6: 306 (1983)

34, Carlquist M., Jörnvall H., Mutt V.;
Isolation and amino sequence of bovine secretin;
FEBS Lett. 127: 71-74 (1981)

35, Cataland S., Crockett S.E., Brown J.C., Mazzaferri E.L.;
Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulation by oral glucose in man;
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 233-228 (1974)

36, Catt K.J., Dufau M.L.;
Introduction: The clinical significance of peptide hormone receptors;
Clin. Endocrinol. Metab. 12(1): XI-XLV (1983)

37, Chamness G.C., McGuire W.L.;
Scatchard plots: common errors in correction and interpretation;
Steroids 26: 538-542 (1975)

38, Chang T.-M., Roth F.L., Tai H.-H., Chey W.Y.;
Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide;
Anal. Biochem. 97: 286-297 (1979)

39, Christophe J.P., Conlon T.P., Gardner J.D.;
Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig;
J. Biol. Chem. 251: 4629-4634 (1976)

40, Christophe J.,Gepts W.,Rosselin G.,Said S.,Yanaihara N.(ed.);
Abstracts of the first international symposium on vasoactive intestinal peptide (VIP) and related peptides;
Regul. Pept. 6: 283-338 (1983)

41, Corder R., Rees L.H.;
Endorphins and enkephalins; S.425-431 in: 21

42, Creutzfeldt W., Arnold R.;
Endocrinology of duodenal ulcer;
World J. Surg. 3: 605-613 (1979)

43, Creutzfeldt W. (ed.);
Gastrointestinal hormones;
Clin. Gastroenterol. 9(3): 483-803 (1980)

44, Cutz E., Chan W., Track N.S., Goth A., Said S.I.;
Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators;
Nature 275: 661-662 (1978)

45, Danek A., O´Dorisio M.S., O´Dorisio T.M., George J.M.;
Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on nonadherent peripheral blood monocytes;
J. Immunol. 131: 1173-1177 (1983)

46, Desbuquois B.;
The interaction of vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver-cell membranes;
Eur. J. Biochem. 46: 439-450

47, Dharmsathaphorn K., Harms V., Yamashiro D.J., Hughes R.J., Binder H.J., Wright E.M.;
Preferential binding of vasoactive intestinal polypeptide to basolateral membrane of rat and rabbit enterocytes;
J. Clin. Invest. 71: 27-35 (1983)

48, Dimaline R., Dockray G.J.;
Molecular variants of vasoactive intestinal peptide in human colonic mucosa;
J. Physiol. (Lond.) 276: 55P-56P (1978)

49, Dimaline R., Reeve J.R., Hanke D., Shively J., Walsh J.H., Dockray G.J.;
Amino acid sequence of rat VIP and partial sequence of a VIP variant;
Regul. Pept. 6: 298 (1983)

50, Dockray G.J.;
Comparative biochemistry and physiology of gut hormones;
Annu. Rev. Physiol. 41: 83-95 (1979)

51, Dulis B.H., Wilson I.B.;
The beta-adrenergic receptor of live human polymorphonuclear leukocytes;
J. Biol. Chem. 255: 1043-1048 (1980)

52, Dupont C., Laburthe M., Broyart J., Bataille D., Rosselin G.;
Cyclic AMP production in isolated colonic epithelial crypts: a highly sensitive model for the evaluation of vasoactive intestinal peptide action in human intestine;
Eur. J. Clin. Invest. 10: 67-76 (1980)

53, Dupont Ch., Broyart J.P., Broer Y., Chenut B., Laburthe M., Rosselin G.;
Importance of the vasoactive intestinal polypeptide in the stimulation of cyclic adenosine 3´,5´-monophosphate in gallbladder epithelial cells of man;
J. Clin. Invest. 67: 742-752 (1981)

54, Dupre J.;
The entero-insular axis and the metabolic effects of gastro-entero-pancreatic polypeptides; S.711-732 in: 43

55, Eberle F., Martini G.A., Scheuer A., Rohr G., Söhl R., Bischof W., Wahl R.;
Thymuskarzinoid und multiple endokrine Neoplasie Typ I;
Internist (Berlin) 23: 718-724 (1982)

56, Edvinsson L., Fahrenkrug J., Hanko J., Owman C., Sundler F., Uddman R.;
VIP(vasoactive intestinal polypeptide)-containing nerves of intracranial arteries in mammals;
Cell Tissue Res. 208: 135-142 (1980)

57, Eisen S.A., Wedner H.J., Parker C.W.;
Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns;
Immunol. Commun. 1: 571-577 (1972)

58, Enna S.J.;
Basic receptor methods I; S.33-52 in: 165

59, Erspamer V.;
The tachykinin peptide family;
Trends Neurosci. 4: 267-269 (1981)

60, Estival A., Mounielou P., Trocheris V., Scemama J.L., Clemente F., Hollande E., Ribet A.;
Presence of VIP receptors in a human pancreatic adenocarcinoma cell line. Modulation of the cAMP response during cell proliferation;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 111: 958-963 (1983)

61, Fahrenkrug J., Schaffalitzky de Muckadell O.B.;
Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in plasma;
J. Lab. Clin. Med. 89: 1379-1388 (1977)

62, Fahrenkrug J., Schaffalitzky de Muckadell O., Fahrenkrug A.;
Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human cerebrospinal fluid;
Brain Res. 124: 581-584 (1977)

63, Fahrenkrug J.;
Physiological role of VIP in digestion; S.385-391 in: 21

64, Field M., Chang E.B.;
Pancreatic cholera: Is the diarrhea due to VIP?;
N. Engl. J. Med. 309: 1513-1515 (1983)

65, Fisher J.A., O´Dorisio M.S., Grever M.R., O´Dorisio T.M.;
The use of vasoactive intestinal polypeptide and adenosine deaminase as biochemical markers in leukemia; S.513-514 in:
Yohn D.S., Blakeslee J.R. (eds.);
Advances in comparative leukemia research;
New York, Elsevier (1982)

66, Ford W.L.;
The preparation and labelling of lymphocytes;Kap.23 in: 180

67, Forssman W.-G. (Interview);
Das Ende des Dualismus;
MMW 125: 35 (1983)

68, Fussganger R.D., Kahn C.R., Roth J., De Meyts P.;
Binding and degradation of insulin by human peripheral granulocytes;
J. Biol. Chem. 251: 2761-2769 (1976)

69, Gaginella T.S., Hubel K.A., O´Dorisio T.M.;
Effects of vasoactive intestinal peptide on intestinal chloride secretion; S.211-222 in: 155

70, Gaginella T.S., Mekhjian H.S., O´Dorisio T.M.;
Vasoactive intestinal peptide: Quantification by radioimmunoassay in isolated cells, mucosa, and muscle of the hamster intestine;
Gastroenterology 74: 718-721 (1978)

71, Gambhir K.K., Archer J.A., Bradley C.J.;
Characteristics of human erythrocyte insulin receptors;
Diabetes 27: 701-708 (1978)

72, Gammeltoft S., Staun-Olsen P., Fahrenkrug J.;
Receptors for vasoactive intestinal polypeptide in hepatocytes isolated from rat or pig;
Regul. Pept. Suppl.1: S40 (1980)

73, Gavin J.R.III, Gorden P., Roth J., Archer J.A., Buell D.N.;
Characteristics of the human lymphocyte insulin receptor;
J. Biol. Chem. 218: 2202-2207 (1973)

74, Gavin J.R.;
Polypeptide hormone receptors on lymphoid cells;S.357-387 in:
Hadden J.W., Coffey R.G., Spreafico F. (eds.);
Immunopharmacology;
New York, Plenum (1977)

75, Glass G.B.J. (ed.);
Gastrointestinal hormones;
New York, Raven (1980)

76, Goldstein A.L., Low Th.K., Thurman G.B., Zatz M.M., Hall N., Chen J., Hu S.-K., Naylor P.B., McClure J.E.;
Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland; S.369-415 in:
Greep R.O. (ed.);
Recent progress in hormone research, Vol. 37;
New York, Academic Press (1981)

77, Goodwin J.S., Wiik A., Lewis M., Bankhurst A., Williams R.;
High-affinity binding sites for prostaglandin E on human lymphocytes;
Cell. Immunol. 43: 150-159 (1979)

78, Greenwood F.C., Hunter W.M., Glover J.S.;
The preparation of 131J-labelled human growth hormone of high specific activity;
Biochem. J. 89: 114-123 (1963)

79, Grossman M.I., Adelson J.W., Rothman S.S., Brown J., Said S., Lin T.-M., Chance R., Grossman M.I., Gerring E., Gregory H., Glass G.B.J., Andersson S., Nasset E., Sasaki H., Faloona G., Unger R., Creutzfeldt M., Kokas E., Thompson J.;
Candidate hormones of the gut;
Gastroenterology 67: 730-755 (1974)

80, Guerrero J.M., Prieto J., Elorza F., Ramirez R., Goberna R.;
Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells;
Mol. Cell. Endocrinol. 21: 151-160 (1981)

81, Guerrero J.M., Prieto J.C., Ramirez-Cardenas R., Calvo J.R., Goberna R.;
Properties of vasoactive intestinal peptide-receptor interaction in rat liver membranes;
Rev. Esp. Fisiol. 37: 1-8 (1981)

82, Guerrero J.M., Calvo J.R., Molinero P., Goberna R.;
Specific activation of cyclic AMP-dependent protein kinase by VIP in human blood mononuclear cells;
Regul. Pept. 6: 306 (1983)

83, Guillemin R.;
A summary of current studies with somatocrinin, growth hormone releasing factor;
Clin. Res. 31: 338-341 (1983)

84, Guth P.S.;
The structurally specific, stereospecific, saturable binding of pepperoni to pizza;
Trends Pharmacol. Sci. 3: 467 (1982)

85, Hall N.R., Lewis J.K., Schimpff R.D., Smith R., Trescott A., Gray H., Wenzel S., Abraham C., Zornetzer S.;
Effects of diencephalic and brainstem lesions on hemopoietic stem cells;
Soc. Neurosci. Abstr. 4: 20 (1978)

86, Hansky J.;
Application of receptor science to gastrointestinal disorders; S.140-146 in:
Boehringer Ingelheim (ed.);
Receptor update, with special reference to pirenzepine, a selective muscarinic blocking drug;
Excerpta Medica Asia Pacific Congress Series 13 (1982)

87, Harris N.W.S., Osborne D.H., Carter D.C.;
Management of the patient presenting as an emergency with hypergastrinemia;
World J. Surg. 6: 710-717 (1982)

88, Herzenberg L.A., Sweet G., Herzenberg L.A.;
Fluorescence-activated cell sorting;
Sci. Am. 234: 108-117 (1976)

89, Hollenberg M.D., Cuatrecasas P;
Hormone receptors and membrane glycoproteins during in vitro transformation of lymphocytes; S.423-434 in:
Clarkson B., Baserga R. (eds.);
Control of proliferation in animal cells;
New York 1974

90, Holst J.J.;
Gut glucagon, enteroglucagon, gut glucagonlike immunoreactivity, glicentin - current status;
Gastroenterology 84: 1602-1613 (1983)

91, Hunt S.V.;
Separation of lymphocyte sub-populations; Kap.24 in: 180

92, Hunter W.M.;
Radioimmunoassay; Kap.14 in: 180

93, Itoh N., Obata K.-I., Yanaihara N., Okamoto H.;
Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27;
Nature 304: 547-549 (1983)

94, Jacobs S., Cuatrecasas P.;
The mobile receptor hypothesis for cell membrane receptor action;
Trends Biochem. Sci. 2: 280-282 (1977)

95, Jaffe B.M., Behrman H.R.;
Methods of hormone radioimmunoassay; S.257
New York, Academic Press (1974)

96, Jaffe B.M.;
To be or not to VIP;
Gastroenterology 76: 417-420 (1979)

97, Jörnvall H., Carlquist M., Kwauk S., Otte S., McIntosh C., Brown J., Mutt V.;
Amino acid sequence and heterogeneity of gastric inhibitory polypeptide;
FEBS Lett. 123: 205-210 (1981)

98, Kahn C.R.;
Membrane receptors for polypeptide hormones; S.81-146 in:
Korn E.D. (ed.);
Methods in membrane biology Vol.3: Plasma membranes;
New York, Plenum (1975)

99, Kahn C.R.;
Membrane receptors for hormones and neurotransmitters;
J. Cell Biol. 70: 261-286 (1976)

100, Kane M.G., O´Dorisio T.M., Krejs G.J.;
Production of secretory diarrhea by intravenous infusion of vasoactive intestinal polypeptide;
N. Engl. J. Med. 309: 1482-1485 (1983)

101, Karlson P.;
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler;
Stuttgart, Thieme (11,1980)

102, Karnushina I.L., Spatz M., Bembry J.;
Cerebral endothelial cell culture, I.The presence of beta2- and alpha2-adrenergic receptors linked to adenylate cyclase activity;
Life Sci. 30: 849-858 (1982)

103, Krejs G.J., Fordtran J.S., Bloom S.R., Fahrenkrug J., Schaffalitzky de Muckadell O., Fischer J., Humphrey C., O´Dorisio T., Said S., Walsh J., Shulkes A.;
Effect of VIP infusion on water and ion transport in the human jejunum;
Gastroenterology 78: 722-727 (1980)

104, Laburthe M., Bataille D., Rosselin G.;
Vasoactive intestinal peptide (VIP): variation of the jejuno-ileal content in the developing rat as measured by radioreceptorassay;
Acta Endocrinol. (Copenh.) 84: 588-599 (1977)

105, Laburthe M., Mangeat P., Marchis-Mouren G., Rosselin G.;
Activation of cyclic AMP-dependent protein kinases by vasoactive intestinal peptide (VIP) in isolated epithelial cells from rat;
Life Sci. 25: 1931-1938 (1979)

106, Laburthe M., Prieto J.C., Amiranoff B., Dupont C., Hui Bon Hoa D., Rosselin G.;
Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated epithelial cells from rat, 2. Characterization and structural requirements of the stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide on production of adenosine 3′:5′-monophosphate;
Eur. J. Biochem. 96: 239-248 (1979)

107, Laburthe M., Rosselin G., Rousset M., Zweibaum A., Korner M., Selinger Z., Schramm M.;
Transfer of the hormone receptor for vaso-intestinal peptide to an adenylate cyclase system in another cell;
FEBS Lett. 98: 41-43 (1979)

108, Laburthe M.,Boissard C.,Chevalier G.,Zweibaum A.,Rosselin G.;
Peptide receptors in human lung tumor cells in culture: Vasoactive intestinal peptide (VIP) and secretin interaction with the Calu-1 and SW-900 cell lines;
Regul. Pept. 2: 219-230 (1981)

109, Larsson L.-I., Fahrenkrug J., Schaffalitzky de Muckadell O., Sundler F., Hakanson R., Rehfeld J.F.;
Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 3197-3200 (1976)

110, Locke S.E., Hornig-Rohan M. (eds.);
Mind and immunity: behavioral immunology, an annotated bibliography 1976-1982;
New York, Institute for the Advancement of Health (1983)

111, Londong W., Büchler M.W., Feifel G., Forssmann W.G., Helmstädter V., Zumtobel V.;
Antral G-cell hyperplasia - an important differential diagnosis for surgical treatment of peptic ulcer disease;
Regul. Pept. Suppl. 1:S70 (1980)

112, Long R., Bryant M., Mitchell S., Adrian T.,Polak J.,Bloom S.;
Clinicopathological study of pancreatic and ganglioneuroblastoma tumours secreting vasoactive intestinal polypeptide (vipomas);
Br. Med. J. 282: 1767-1771 (1981)

113, Long R.G., Bryant M.G., Yuille P.M., Polak J.M., Bloom S.R.;
Mixed pancreatic apudoma with symptoms of excess vasoactive intestinal polypeptide and insulin: improvement of diarrhea with metoclopramide;
Gut 22: 505-511 (1981)

114, Lundberg J.M., Hökfelt T.;
Coexistence of peptides and classical neurotransmitters;
Trends Neurosci. 6: 325-333 (1983)

115, Marx S.J., Aurbach G.D., Gavin J.R.III, Buell D.W.;
Calcitonin receptors on cultured human lymphocytes;
J. Biol. Chem. 249: 6812-6816 (1974)

116, Moore G.E., Gerner R.E., Franklin H.A.;
Culture of normal human leukocytes;
JAMA 199: 87-92 (1967)

117, Moore R.Y.;
The suprachiasmatic nucleus and the organization of a circadian system;
Trends Neurosci. 5: 404-407 (1982)

118, Morrison J.H., Magistretti P.J.;
Monoamines and peptides in cerebral cortex - contrasting principles of cortical organization;
Trends Neurosci. 6: 146-151 (1983)

119, Motulsky H.J., Insel P.A.;
Adrenergic receptors in man;
N. Engl. J. Med. 307: 18-29 (1982)

120, Murphy R.F., Franco R.S., Chen M., Vorhees M., Joffe S.N., Madden M., Johnston C.F., Ardill J.E.S., Buchanan K.D., Bridges J.M., O´Dorisio M.S., O´Dorisio T.M., Cataland S., Balcerzak S.P.;
Letters to the editor;
J. Lab. Clin. Med. 99: 294-298 (1982)

121, Mutt V., Said S.I.;
Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide;
Eur. J. Biochem. 42: 581-589 (1974)

122, Mutt V.;
New approaches to the identification and isolation of hormonal polypeptides;
Trends Neurosci. 6: 357-360 (1980)

123, Neumüller O.-A.;
Basis-Römpp. Taschenlexikon der Chemie, ihrer Randgebiete und Hilfswissenschaften;
Stuttgart, Franckh (1977)

124, Nilsson A.;
Structure of the vasoactive intestinal octacosapeptide from chicken intestine. The amino acid sequence;
FEBS Lett. 60: 322-326 (1975)

125, Odell W.D., Daughaday W.H. (eds.);
Principles of competitive protein-binding assays;
Philadelphia, Lippincott (1971)

126, O´Dorisio M.S., O´Dorisio T., Cataland S., Balcerzak S.;
Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes;
J. Lab. Clin. Med. 96: 666-672 (1980)

127, O´Dorisio M.S., Hermina N., O´Dorisio T.M., Balcerzak S.P.;
Vasoactive intestinal polypeptide modulation of lymphocyte adenylate cyclase;
J. Immunol. 127: 2551-2554 (1981)

128, O´Dorisio M.S.;
Persönliche Mitteilung (1982)

129, O´Dorisio M.S., Vassalo L.M.;
Uncoupling of vasoactive intestinal polypeptide (receptor) from adenylate cyclase in human T-Lymphocyte;
Clin. Res. 31: 349 A (1983)

130, O´Dorisio T.M.;
Pathophysiology of VIP II; S.484-487 in: 19

131, O´Dorisio T.M.;
Persönliche Mitteilung (1980)

132, Ottesen B., Larsen J.-J., Fahrenkrug J., Sternquist M., Sundler F.;
Distribution and motor effects of VIP in female genital tract;
Am. J. Physiol. 240: E22-E36 (1981)

133, Overhage J.M., Felten S.Y., Schmedtje J.F., Felten D.L.;
Sympathetic innervation of the rabbit appendix: further evidence for neural input to lymphoid tissue;
Soc. Neurosci. Abstr. 7: 221 (1981)

134, Palaszynski E.W., Moody T.W., O´Donohue T.L., Goldstein A.L.;
Thymosin α_1-like peptides: Localization and biochemical characterization in the rat brain and pituitary gland;
Peptides (Fayetteville) 4: 463-467 (1983)

135, Papka R.E., Della N.G., Furness J.B., Costa M.;
Association of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive fibers with the cardiovascular system of guinea-pigs;
Soc. Neurosci. Abstr. 7: 117 (1981)

136, Parker C.W.;
Role of cyclic nucleotides in regulating lymphocytes;
Ann. N. Y. Acad. Sci. 332: 255-261 (1979)

137, Payan D.G., Brewster D.R., Goetzl E.J.;
Specific stimulation of human T-Lymphocytes by substance P;
J. Immunol. 131: 1613-1615 (1983)

138, Pearse A.G.E., Polak J.M.;
The diffuse neuroendocrine system and the APUD concept;
S. 33-39 in: 19

139, Polak J.M., Gu J., Mina S., Bloom S.R.;
VIPergic nerves in the penis;
Lancet 2: 217-219 (1981)

140, Polosatov M.V., Skatchkov A.P., Malov Y.S., Kulik V.P., Samartsev M., Prussakov A., Nikolov N., Klimov P., Vunsh E.;
The effect of gastro-intestinal peptide hormones on the white blood elements; (Russisch, englische Zusammenfassung)
Fiziol. Zh. SSSR 65: 1527-1531 (1979)

141, Potter D.D., Furshpan E.J., Landis S.C.;
Multiple-transmitter status and "Dale´s priciple";
Neuroscience Commentaries 1: 1-9 (1981)

142, Powanda M.C., Beisel W.R.;
Hypothesis: leukocyte endogenous mediator/ endogenous pyrogen/ lymphocyte activating factor modulates the development of nonspecific and specific immunity and affects nutritional status;
Am. J. Clin. Nutr. 35: 762-768 (1982)

143, Prieto J., Laburthe M., Rosselin G.;
Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat, 1, Characterization, quantitative aspects, and structural requirements of binding sites;
Eur. J. Biochem. 96: 229-237 (1979)

144, Raff M.C.;
Cell-surface immunology;
Sci. Am. 234: 30-39 (1976)

145, Rehfeld J.F.;
Historical background; S.10-16 in: 21

146, Robberecht P., Conlon T.P., Gardner J.D.;
Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig;
J. Biol. Chem. 251: 4635-4639 (1976)

147, Robberecht P., De Neef Ph., Lammens M., Deschodt-Lanckman M., Christophe J.-P,;
Specific binding of vasoactive intestinal peptide to brain membranes from the guinea pig;
Eur J. Biochem. 90: 147-154 (1978)

148, Robberecht P., Chatelain P., De Neef Ph., Camus J.-C., Waelbroeck M., Christophe J.;
Presence of vasoactive intestinal peptide receptors coupled to adenylate cyclase in rat lung membranes;
Biochim. Biophys. Acta 678: 76-82 (1981)

149, Rosenthal H.E.;
A graphic method for the determination and representation of binding parameters in a complex system;
Anal. Biochem. 20: 525-532 (1967)

150, Roth J., LeRoith D., Shiloach J., Rosenzweig J., Lesniak M., Havrankova J.;
The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters and other extracellular chemical messengers;
N. Engl. J. Med. 306: 523-527 (1982)

151, Said S.I.;
Vasoactive substances in the lung; S.223-228 in:
U.S.Dept. of Health, Education and Welfare (ed.);
Current research in chronic obstructive lung disease;
Washington, Public Health Service (1967)

152, Said S.I., Mutt V.;
Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine;
Science 169: 1217-1218 (1970)

153, Said S.I., Mutt V.;
Isolation from porcine-intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and glukagon;
Eur. J. Biochem. 28: 199-204 (1972)

154, Said S.I.;
VIP overview; S.379-384 in: 21

155, Said S.I. (ed.);
Vasoactive intestinal peptide;
(Advances in peptide hormone research Vol.1);
New York, Raven (1982)

156, Scatchard G.;
The attraction of proteins for small molecules and ions;
Ann. N. Y. Acad. Sci. 5: 660-672 (1949)

157, Schaffalitzky de Muckadell O.B., Fahrenkrug J., Holst J.J., Lauritsen K.B.;
Release of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) by intraduodenal stimuli;
Scand. J. Gastroenterol. 12: 793-799 (1977)

158, Schindler G., Pirschel J., Grehn S.;
Optimierung der peroralen Cholezyst-Cholangiographie mit Ceruletid;
Fortschr. Röntgenstr. 130: 423-431 (1979)

159, Schmiegel W.-H., Hamann A., Thiele H.-G.;
Darmassoziiertes Immunsystem: Lokale Immunantwort - systemische Toleranz;
Dtsch. Med. Wochenschr. 107: 267-270 (1982)

160, Schusdziarra V., Pfeiffer E.F.;
Gastrointestinale Endokrinopathien;
Med. Welt 33: 12-21 (1982)

161, Schwartz R.H., Bianco A.R., Handwerger B.S., Kahn R.C.;
Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocytes: implications for studies of insulin-resistant states in man;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 474-478 (1975)

162, Shimada K., Yazaki Y.;
Binding sites for angiotensin II in human mononuclear leucocytes;
J. Biochem. (Tokyo) 84: 1013-1015 (1978)

163, Shipman C.H.;
Evaluation of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) as a tissue culture buffer;
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130: 305-310 (1969)

164, Siegenthaler W., Jenny S., Meier B.;
Körperliche Ausdrucksformen und Habitus; S.3.1-3.33 in:
Siegenthaler W. (ed.);
Differentialdiagnose innerer Krankheiten;
Stuttgart, Thieme (14,1980)

165, Society for Neuroscience (ed.);
1980 short course syllabus: receptor binding techniques;
Bethesda (1980)

166, Spiro H.M.;
Clinical gastroenterology;
S.186-206: Gastric disorders, general considerations;
New York, Macmillan (3,1983)

167, Sundler F., Carraway R., Hakanson R., Alumets J., Dubois M.;
Immunoreactive neurotensin and somatostatin in the chicken thymus;
Cell Tissue Res. 194: 367-376 (1978)

168, Tatemoto K., Mutt V.;
Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon-secretin family;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6603-6607 (1981)

169, Taylor D.P., Pert C.B.;
Vasoactive intestinal polypeptide: specific binding to rat brain membranes;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 660-664 (1979)

170, Teichmann R., Andress H., Gycha S., Seifert J., Brendel W.;
Die immunologische Reaktivität des Antrums zur Stimulation von Verdauungsprozessen;
Langenbecks Arch. Chir. Suppl.: 5-8 (1983)

171, Tiedemann K., Long R.G., Pritchard J., Bloom S.R.;
Plasma vasoactive intestinal polypeptide and other regulatory peptides in children with neurogenic tumours;
Eur. J. Pediatr. 137: 147-150 (1981)

172, Unwin R.J., Calam J., Peart W.S., Dimaline R., Lightman S.L., Friesen S.R.;
Vipoma and watery diarrhea;
N. Eng. J. Med. 307: 377-378 (1982)

173, Usadel K.-H., Leuschner U., Überla K.K.;
Treatment of acute pancreatitis with somatostatin: a multicenter double-blind trial;
N. Eng. J. Med. 303: 999-1000 (1980)

174, Verner J.V., Morrison A.B.;
Endocrine pancreatic islet disease with diarrhea;
Arch. Intern. Med. 133: 492-500 (1974)

175, Waelbroeck M., Robberecht P., De Neef Ph., Chatelain P., Christophe J.;
Binding of vasoactive intestinal peptide and its stimulation of adenylate cyclase through two classes of receptors in rat liver membranes, effects of secretin and 12 secretin analogues and 2 secretin fragments;
Biochim. Biophys. Acta 678: 83-90 (1981)

176, Wagner P.K., Rothmund M., Grönniger J.;
Sekretin versus Somatostatin bei akuter Blutung aus gastroduodenalen Ulcera und Erosionen, eine randomisierte Studie;
Klin. Wochenschr. 61: 285-289 (1983)

177, Walsh J.H. (ed.);
The brain-gut axis: a new frontier;
Peptides (Fayetteville) 2: Suppl.2 (1981)

178, Weber E., Evans Ch.J., Barchas J.D.;
Multiple endogenous ligands for opioid receptors;
Trends Neurosci. 6: 333-336 (1983)

179, Wedner J.;
Cyclic nucleotides in the immune response; S.763-785 in:
Kebabian J.W., Nathanson J.A. (eds):
Cyclic nucleotides II: physiology and pharmacology
(Handb. exp. Pharm. Bd. 58/2);
Berlin, Springer (1982)

180, Weir D.M. (ed.);
Handbook of experimental immunology;
Oxford, Blackwell (3,1978)

181, Wesley J.R., Vinik A.I., O´Dorisio T.M., Glaser B., Fink A.;
A new syndrome of symptomatic cutaneous mastocytoma producing vasoactive intestinal polypeptide;
Gastroenterology 82: 963-967 (1982)

182, Yanaihara N., Sakagami M., Sato H., Yamamoto K.,Hashimoto T., Yanaihara C., Ito Z., Yamaguchi K., Abe K.;
Immunological aspects of secretin, substance P, and VIP;
Gastroenterology 72: 803-810 (1977)

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits bei folgenden Gelegenheiten vorgestellt worden:

Poster auf dem "International Symposium on Brain-Gut Axis: The New Frontier", 29. Juni - 1. Juli 1981, Florenz
(Danek A., O´Dorisio S., O´Dorisio T., George J.;
Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on human T-lymphocytes; S.44 in: 7)

Vortrag vor der "Central Society for Clinical Research", Chicago, USA, 5. November 1981
(O´Dorisio M.S., Danek A., O´Dorisio T., George J., Balcerzak S.;
Specific vasoactive intestinal peptide (VIP) binding to T-lymphocytes;
Clin. Res. 29: 762A (1981))

Vortrag vor dem wissenschaftlichen Forum der Medizinstudenten der Ohio State University, 18. März 1982
("Landacre Society´s 26th Annual Landacre Day Medical Student Scientific Session" - Aufnahme von Adrian Danek als Ehrenmitglied der Gesellschaft)

Poster auf dem Jahrestreffen der "American Federation for Clinical Research", Washington D.C., USA, 10. Mai 1982
(O´Dorisio M.S., Danek A., O´Dorisio T., George J., Balcerzak S.;
Specific vasoactive intestinal peptide (VIP) binding to T-lymphocytes;
Clin. Res. 30: 326A (1982))

Publikation im "Journal of Immunology", September 1983
(Danek A., O´Dorisio M.S., O´Dorisio T.M., George J.M.;
Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on nonadherent peripheral blood lymphocytes;
J. Immunol. 131: 1173-1177 (1983))

Abkürzungen

cAMP...zyklisches Adenosin-3´,5´-Monophosphat

CCK....Cholezystokinin = Pankreozymin

cpm....counts per minute (gezählte Zerfälle pro Minute)

DHA....Dihydroalprenolol

dpm....decays per minute (Zerfälle pro Minute)

GIP....Gastric Inhibitory Polypeptide

Hepes..N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N´-2-äthansulfonsäure

hpGRF..human pancreatic growth hormone releasing factor

HPLC...high performance liquid chromatography

HSA....menschliches Serum-Albumin

IMX....Isobutylmethylxanthin

IU.....Internationale Einheiten

IUPAC..International Union of Pure and Applied Chemistry

n.b....nicht bestimmt

PHI....das Peptid mit N-terminalem Histidin und C-terminalem Isoleucinamid

PHM....das Peptid mit N-terminalem Histidin und C-terminalem Isoleucinamid

RPMI...Roswell Park Memorial Institute

SBSS...Seligmann balanced salt solution

VIP....Vasoaktives Intestinales Peptid

Zusammensetzung verwendeter Lösungen

SELIGMANN BALANCED SALT SOLUTION (S.20 und Abb.3)
enthält pro Liter deionisiertes destilliertes Wasser:

NaCl.....7650mg
KCl.....200mg
$NaCO_2CH_3$.....1500mg
$NaH_2PO_4 xH_2O$.....50mg
KH_2PO_4.....100mg
D-Glukose.....1000mg
$NaHCO_3$.....700mg
Ascorbinsäure.....3mg

FICOLL(R)-HYPAQUE(R)-LÖSUNG (S.20 und Abb.3)

1, 180g Ficoll(R) in 2l destilliertem Wasser lösen.
2, 566,6ml Hypaque(R) mit 268,0ml destilliertem Wasser mischen.
3, Beide Lösungen vereinigen, sterilfiltrieren, lichtgeschützt bei Zimmertemperatur aufbewahren

CAMCO QUIK STAIN (S.24 und Tab.2)

ist eine Lösung aus 89 Gewichtsprozent Methanol, ferner Puffern und nicht aktiven Stabilisatoren mit 0,4 Gewichtsprozent der Färbelösung (Methylenblau 0,9g, EosinY 1,0g, Na_2HCO_3 0,5g, 600ml Aquadest, zusätzlich Methanol).

CHLORAMIN T-LÖSUNG (S.26)

25mg Chloramin T (Tosylchloramid-Natrium) werden in 10ml des unten angegebenen Natriumphosphatpuffers gelöst.

NATRIUMMETABISULFIT-LÖSUNG (S.26)

24mg $Na_2S_2O_5$ werden in 10ml des Natriumphosphatpuffers gelöst.

NATRIUMPHOSPHATPUFFER 0,05M, pH7,5

1, 860mg NaCl, 150mg NaN_3, 720mg dibasisches Na-Phosphat in 100ml deionisiertem Wasser lösen.
2, 340mg monobasisches Na-Phosphat in 50ml deionisiertem Wasser lösen.
3, Der pH von Lösung 1 wird mit einer geeigneten Menge von Lösung 2 auf 7,5 eingestellt.

REAGENTIEN DES VIP-RADIOIMMUNASSAY (Tab.3)

Normales Kaninchenserum (Colorado Serum Company No.CS-1403) wird 1:50 mit dem 0,2molaren Glyzin-Puffer (mit NaOH auf pH 8,8 eingestellt/vgl. S.27) verdünnt.

EDTA wird als 0,1molare Lösung zubereitet und mit NaOH auf einen pH von 7,5 gebracht.

Aprotinin (Trasylol(R), Bayer, Leverkusen) wird 1:1 mit dem 2%igen Kaninchenserum verdünnt.

Die VIP-Standards werden als Verdünnungsreihe einer Stammlösung (1,628µg lyophilisiertes VIP, von Peninsula, resuspendiert in 10ml 0,05N Essigsäure) mit dem 2%igen Kaninchenserum so hergestellt, daß Endkonzentrationen von 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 und 200pg in 100µl erreicht werden.

Der VIP-Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:100 000 mit 0,2M Glyzin-Puffer verwendet. 125J-VIP, gewonnen nach der beschriebenen Methode (S.26-29), wurde mit 2% Kaninchenserum so verdünnt, daß 100µl etwa 4000cpm enthielten.

Das Anti-Kaninchen-Antiserum (von der Ziege; Antibodies Inc. No.P-3) war 5:4 mit 0,2M Glyzin-Puffer verdünnt worden.

RPMI 1640 WITH L-GLUTAMINE (S.22, 23, 36 und Abb.3, 6)
enthält in mg/l (nach 116):

l-Arginin	200	PAS	1
l-Asparagin	50	Biotin	0,2
l-Asparaginsäure	20	Calciumpantothenat	0,25
l-Cystin	50	Cholinchlorid	3
l-Glutaminsäure	20	Cyanocobalamin	0,005
l-Glutamin	300	Folsäure	1
Glutathion, reduziert	1	i-Inositol	35
Glyzin	10	Nikotinamid	1
l-Histidin	15	Pyridoxinhydrochlorid	1
l-Hydroxyprolin	20	Riboflavin	0,2
l-Isoleuzin	50	Thiaminhydrochlorid	1
l-Leuzin	50		
l-Lysinhydrochlorid	40	Calciumnitrat($x4H_2O$)	100
l-Methionin	15	$Na_2PO_4x7H_2O$	1,152
l-Phenylalanin	15	$MgSO_4x7H_2O$	100
l-Prolin	20	KCl	400
l-Serin	30	Na_2CO_3	2000
l-Threonin	20	NaCl	6000
l-Tryptophan	5		
l-Tyrosin	20	Glukose	2000
l-Valin	20	Phenolsulphonthalein	5

Danksagungen

Der wesentliche Teil der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit entstand während eines Aufenthaltes an der Ohio State University in Columbus,Ohio,USA. Dieses Gaststudium war durch das Studentenaustauschprogramm des Verbandes Deutsch-Amerikanischer Clubs (Frau Hilde Rittelmeyer) vermittelt worden und die Reisekosten wurden durch ein Fulbright-Reisestipendium getragen.
Dank schulde ich meinen Eltern Dr.Susanne und Dr.Nikolaus Danek für ihre finanzielle Unterstützung.
Für Betreuung während des Aufenthaltes habe ich zu danken: Dr.Jack George und Dr.Tom O´Dorisio an der Division of Endocrinology und Dr. Sue O´Dorisio an der Division of Hematology/Oncology der Ohio State University. Versuchsmaterialien wurden aus Forschungsgeldern der Veteran´s Administration und des National Cancer Institute (RO1CA 29062) bezahlt. Ohne die Blutspender und andere Ungenannte wäre der Aufenthalt erfolglos geblieben.
Meinen Dank für sein Interesse an dem Projekt, die freundliche Wiederaufnahme in München und die Hilfe, die mir bei der Fertigstellung der Arbeit zuteil wurde, möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr.Walter Londong abstatten. Für kritische Bemerkungen danke ich auch meiner Mutter und Dr.Hans Distel.
Die Abteilung für Neuropsychologie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München ermöglichte mir durch die Benützung eines textverarbeitenden Systems den raschen Abschluß des Manuskriptes. Frau Petry beriet mich bei der Gestaltung der Abbildungen.

Lebenslauf

Ich, Adrian Michael Danek, wurde am 21.Februar 1957 in München geboren. Meine Eltern sind Dr.Susanne Danek, geb. Zillich, Zahnärztin, und Dr.Nikolaus Danek, Chirurg.

1963-1967: Volksschule in München

1967-1976: Wittelsbacher Gymnasium, München, humanistischer Zweig
1974: Gastschüler am Kent College, Canterbury, England
1976: Abitur

1976-1983: Medizin-Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1978/79 Mitarbeit am Institut für medizinische Psychologie (Labor für Neuroanatomie, Dr.H.Distel;
Projekt: Tangentialfasern der Kaninchenhirnrinde)
Frühjahr 1979: Ärztliche Vorprüfung

1979/80 Famulaturen in München
(Chirurgische Klinik Dr.Rinecker, Allgemeinarzt Dr.S.Wagner, Betriebsärztlicher Dienst Siemens AG)
Frühjahr 1980: Teil 1 der Ärztlichen Prüfung

1980/81 Gaststudent an der Ohio State University in Columbus,USA
Forschungsprojekt an der Division of Endocrinology (Dr.J.M.George, Dr.T.O´Dorisio) und der Division of Hematology/Oncology (Dr.S.Balcerzak, Dr.S.O´Dorisio)
Famulatur am Department of Surgery and Neurosurgery (Dr.Zollinger, Dr.Carey, Dr.Hunt)
1982/83 studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München
(Neuropsychologische Abteilung: Dr.von Cramon, Dr.Zihl)
Frühjahr 1982: 2 Monate als "elective student" am "National Institute for Neurologic and Communicative Disorders and Stroke" des NIH in Bethesda, Maryland, USA (Dr.DiChiro, Dr.Mishkin, Dr.Fedio, Dr.Caramazza)
Herbst 1982: Teil 2 der Ärztlichen Prüfung

1982/83 Praktisches Jahr
Medizinische Klinik Innenstadt (Prof.Dr.E.Buchborn)
Chirurgische Klinik Großhadern (Prof.Dr.G.Heberer)
Neurologische Universitätsklinik, Bern (Prof.Dr.M.Mumenthaler)
Herbst 1983: Teil 3 der Ärztlichen Prüfung

Dezember 1983: Approbation als Arzt

Seit April 1984: Zivildienst als Arzt an der Neurologischen Klinik des Bezirks Niederbayern, Mainkofen (Prof.Dr.K.L.Birnberger)